

Université du Québec à Trois-Rivières

Mémoire présenté à
l'Université du Québec à Trois-Rivières

Comme exigence partielle
de la maîtrise en biophysique

par
Marc Champagne

Étude de l'interaction directe entre l'actine et les
phospholipides membranaires par la technique des moteurs à
l'actomyosine.

Décembre 1993

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

L'actine est une protéine du cytosquelette présente dans toutes les cellules eucaryotes. Elle joue un rôle prépondérant dans diverses formes de motilité cellulaire, dont la contraction musculaire, la division cellulaire et la phagocytose. Elle intervient aussi dans la morphogénèse et dans le maintien de la forme des cellules. Pour remplir ces diverses fonctions, l'actine doit s'arrimer à la membrane de la cellule. De nombreux travaux ont déjà démontré l'existence de protéines et de complexes protéiques liant l'actine aux lipides membranaires, mais rares sont les chercheurs qui se sont penchés sur la possibilité d'une liaison directe entre l'actine et les lipides.

Jusqu'ici, seule l'équipe du Dr Gicquaud a travaillé sur le mode d'ancrage direct de l'actine aux lipides membranaires. Leurs travaux ont démontré qu'*in vitro* les liposomes peuvent lier l'actine filamenteuse et induire la polymérisation de l'actine monomérique en filaments. Cette interaction directe actine-lipides n'est observée que si les liposomes sont chargés positivement (par l'ajout de cations divalents ou de lipides chargés). Cette interaction est inhibée par des concentrations élevées de potassium mais, comme le montrent les récents travaux de Gicquaud en calorimétrie différentielle à balayage, une interaction subsiste aux concentrations physiologiques de KCl. Toutefois, aucune observation ne permet de savoir si cette interaction est possible *in vivo*. On ne sait pas si l'actine qui interagit ainsi avec les lipides est dans un état fonctionnel, et encore moins si cette interaction est suffisamment forte pour jouer un rôle dans la cellule.

L'objectif de ce projet de recherche est de démontrer que l'interaction directe actine-lipides peut jouer un rôle *in vivo*.

Pour ce faire, nous avons eu recours à la technique des moteurs à l'actomyosine de Kron. Cette technique permet d'observer le déplacement de filaments d'actine sur une surface enduite de myosine. Nous avons ajouté à ces préparations des liposomes ayant préalablement interagi avec de l'actine

purifiée. Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes:

1-Il y a bel et bien une interaction entre l'actine et les phospholipides, et cette interaction semble directe.

2-Cette interaction est suffisamment forte pour permettre le déplacement de liposomes sur une surface de myosine, par l'entremise de l'actine.

3-Il s'agit d'une interaction spécifique entre l'actine et les phospholipides puisque le déplacement des liposomes dépend de la nature des lipides qui les composent.

4-Le déplacement des liposomes implique que les filaments d'actine interagissent à la fois avec les phospholipides et la myosine. Cela suggère que l'actine qui interagit avec les liposomes est dans un état fonctionnel.

5-L'interaction directe de l'actine avec les phospholipides se fait dans des conditions qui sont compatibles avec les conditions *in vivo*.

L'existence d'une telle interaction dans la cellule est donc possible.

N.B.: Afin de présenter de façon dynamique le déplacement des liposomes et des filaments d'actine, une vidéocassette VHS de séquences choisies est disponible (sous le titre de ce mémoire) à la médiathèque de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

REMERCIEMENTS

Je voudrais avant tout remercier mon directeur de maîtrise, le Dr Claude Gicquaud, qui malgré son âge vénérable, empreint de sagesse et de bougonnements, a su plus d'une fois m'étonner par ses nombreuses critiques constructives.

Je me dois de remercier le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie et la Fondation du Centre d'Études Universitaires de Trois-Rivières pour leur soutien financier. Je tiens aussi à remercier ceux qui nous ont gracieusement permis d'utiliser certains appareils: Dr Pierre Couillard (Université de Montréal), Drs Louise Dubé, Christian Salesse, Lucien Vachon et Domenico Miceli (UQTR). Merci à Benoit Pigeon qui m'a permis d'utiliser une des photographies de son mémoire.

Cette maîtrise n'aurait pas été la même sans les nombreuses interactions que j'aie pu avoir avec les membres du dynamique Groupe de Recherche en Biotechnologie des Membranes, particulièrement Hélène (pour avoir tenu les pattes du lapin si innocemment), Marylène (pour de fructueuses discussions), Mira et Nicholas. Je remercie aussi mes nombreuses soeurs qui, en gravitant autour de mon univers, surent alourdir mes souffrances: Cécile, Claude, Isabelle, Josée, Maric-France, Nathalie, Pomme, Rachel, Suzanne et Rachel, François, Jean, Mario, Pablo et bien d'autres folles. Remerciements à California Cooler pour saveur obtenue, à James Hetfield et Sammy Hagar pour mélodies bien senties.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
1- INTRODUCTION.....	1
1.1- GÉNÉRALITÉS SUR LE CYTOSQUELETTE	2
1.1.1- Définition et rôles du cytosquelette.....	2
1.1.2- Interactions cytosquelette-membrane.....	4
1.2- INTERACTION DIRECTE ACTINE-LIPIDES	11
1.2.1- Travaux sur l'interaction directe actine-lipides.....	11
1.2.2- Autres observations supportant l'interaction directe actine-lipides.....	14
1.3- OBJECTIFS ET CHOIX DE LA TECHNIQUE.....	15
1.3.1- Problématique et objectif.....	15
1.3.2- Choix de la technique.....	16
1.3.3- Les moteurs à l'actomyosine de Kron.....	17
2- MATÉRIEL ET MÉTHODES	19
2.0- GÉNÉRALITÉS.....	19
2.1- PRÉPARATION DE L'ACTINE.....	21
2.1.1- Préparation de l'actine à partir de la poudre acétonique.....	21
2.1.2- Purification de l'actine.....	22
2.1.2- Préparation de l'actine fluorescente.....	23
2.2- PURIFICATION DE LA MYOSINE.....	24
2.2.1- Préparation de l'HMM.....	26
2.2.2- Préparation de l'HMM-NEM.....	27
2.3- PRÉPARATION DES LIPOSOMES FLUORESCENTS	27
2.4- LES MÉLANGES ACTINE-LIPOSOMES.....	29
2.5- PRÉPARATION DES MOTEURS À L'ACTOMYOSINE DE KRON.....	32
2.5.1- Confection de la lame à puits.....	32

2.5.2- Les perfusions.....	33
2.5.3- Conditions standards employées dans nos moteurs à l'actomyosine.....	34
2.6- ÉQUIPEMENT POUR LA MICROSCOPIE	36
2.7- THERMORÉGULATION.....	38
2.8- IMPRESSION DES IMAGES	38
2.9- MÉTHODOLOGIE POUR LE CALCUL DE L'INDICE DE MOTILITÉ.....	39
2.10- MÉTHODOLOGIE POUR LE CALCUL DE LA VITESSE	40
3- RÉSULTATS.....	42
3.0- FACTEURS NÉCESSAIRES AU MOUVEMENT DES LIPOSOMES.....	42
3.1- DESCRIPTION DES MOUVEMENTS DES LIPOSOMES.....	46
3.1.1- Le déplacement des filaments d'actine.....	47
3.1.2- Le déplacement des liposomes.....	50
3.1.3- La vitesse des liposomes.....	54
3.2- EFFET DU MAGNÉSIUM.....	56
3.3- EFFET DU POTASSIUM.....	57
3.4- EFFET DE LA MÉTHYLCELLULOSE.....	59
3.5- RÉSUMÉ.....	61
4- DISCUSSION	62
4.1- MODÉLISATION DE L'INTERACTION ACTINE-MYOSINE-LIPOSOME.....	62
4.1.1- Le déplacement des liposomes est un mouvement actif qui dépend de l'interaction actine-myosine.....	62
4.1.2- Le déplacement des liposomes dépend d'une interaction spécifique et directe entre l'actine et les liposomes.....	63
4.1.3- Mécanismes à la base des divers mouvements des liposomes.....	65
4.1.4- La vitesse des liposomes.....	70
4.2- NATURE DE L'INTERACTION DIRECTE ACTINE-PHOSPHOLIPIDES	71
4.2.1- C'est une interaction principalement électrostatique.....	71
4.2.2- Ce n'est pas interaction de nature hydrophobe.....	72
4.2.3- Modèle moléculaire de l'interaction actine-lipides.....	74
4.3- L'INTERACTION DIRECTE ACTINE-LIPIDES ET LA LITTÉRATURE.....	81

4.4- L'INTERACTION DIRECTE ACTINE-PHOSPHOLIPIDES PEUT-ELLE JOUER UN RÔLE IN VIVO ?	83
4.4.1- Ce phénomène peut avoir lieu in vitro dans des conditions mimant les conditions in vivo?.....	84
4.4.2- L'actine qui interagit avec les lipides est-elle dans un état fonctionnel ?.....	88
4.4.3- L'interaction directe actine-lipides est-elle suffisamment forte pour jouer un rôle in vivo ?.....	88
4.4.4- L'interaction directe actine-phospholipides peut-elle jouer un rôle in vivo ?.....	89
5- CONCLUSIONS	91
BIBLIOGRAPHIE	92

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Classes de protéines accessoires liant l'actine.....	4
Figure 2. Mode de liaison des protéines à la bicouche lipidique.....	6
Figure 3. Mode d'ancrage du cytosquelette à la membrane érythrocytaire.....	8
Figure 4. Liaison de l'actine à la membrane par l'entremise de la dystrophine.....	8
Figure 5. Mode d'ancrage du cytosquelette à la membrane au niveau des adhésions focales.....	9
Figure 6. Mode d'ancrage de l'actine à la membrane des cellules en migration	10
Figure 7. Interaction de l'actine avec une surface enduite de myosine.....	18
Figure 8. Schéma d'une lame à puits.....	32
Figure 9. La perfusion à 45°.....	34
Figure 10. La perfusion à l'horizontale.....	34
Figure 11. Montage de l'équipement pour la microscopie-vidéo.....	37
Figure 12. Position des filaments d'actine se déplaçant sur une surface de myosine.....	48
Figure 13. Déplacement de filaments d'actine dans les moteurs à l'actomyosine.....	49
Figure 14. Déplacement de liposomes dans les moteurs à l'actomyosine.....	51
Figure 15. Position de liposomes se déplaçant sur une surface de myosine	52
Figure 16. Distribution de fréquence (en pourcentage) des vitesses instantanées des liposomes et des filaments d'actine.....	54
Figure 17. Effet du magnésium sur l'indice de motilité des liposomes et des filaments d'actine.....	56
Figure 18. Effet du potassium sur l'indice de motilité des liposomes et des filaments d'actine.....	58

Figure 19. Effet de la méthylcellulose sur l'indice de motilité des filaments d'actine.....	60
Figure 20. Effet de la méthylcellulose sur l'indice de motilité des liposomes	61
Figure 21. Exemple de mouvements non-spécifiques.....	64
Figure 22. Organisations possibles de l'actine interagissant avec la surface des liposomes.....	67
Figure 23. Coloration négative d'actine interagissant avec des liposomes	69
Figure 24. Orientation moléculaire des têtes polaires de la phosphatidylcholine en absence ou en présence de charges positives.....	76
Figure 25. Liaison de l'actine aux phospholipides par l'entremise des cations divalents.....	77
Figure 26. Liaison de l'actine à la choline des phosphatidylcholines.....	78
Figure 27. Structure moléculaire du DOPC et du DSPC.....	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition des tampons-G.....	21
Tableau 2. Composition du tampon AB.....	23
Tableau 3. Composition des solutions pour la préparation de la myosine.....	24
Tableau 4. Composition des solutions pour la préparation de l'HMM.....	26
Tableau 5. Composition des solutions AB 3x.....	29
Tableau 6. Conditions ioniques des mélanges actine-liposomes.....	31
Tableau 7. Conditions dans lesquelles le déplacement de liposomes a été observé	44
Tableau 8. Indices de motilité des liposomes de DSPC et de DOPC.....	46
Tableau 9. Estimation de la vitesse des filaments d'actine et des liposomes	55

1- INTRODUCTION

L'actine est sans contredit la protéine la plus étudiée du cytosquelette. Bien qu'elle soit présente dans toutes les cellules eucaryotes, c'est une des protéines dont la séquence en acides aminés est la mieux conservée. Elle est souvent la protéine la plus concentrée dans le cytoplasme et interagit avec une foule d'autres protéines. L'actine intervient autant dans le maintien de la forme des cellules que dans la division cellulaire, l'endocytose et l'exocytose, et dans de nombreuses formes de motilité, dont la plus connue est la contraction musculaire.

Toutes les cellules, sans exception, sont délimitées par une membrane constituée d'une bicouche de lipides et de protéines. Cette structure a des propriétés qui lui permettent non seulement de confiner le cytoplasme, mais aussi d'en contrôler la composition. Ainsi les membranes, cellulaires et intracellulaires, peuvent contribuer à fournir un environnement propice au métabolisme cellulaire.

L'actine et la membrane cellulaire sont en relation étroite. La membrane est une structure fragile et doit être soutenue par un "squelette". L'actine doit quant à elle interagir avec la membrane, autant pour positionner l'ensemble des constituants cellulaires que pour transformer ses glissements par rapport à la myosine en mouvements cellulaires. Malgré le fait que l'actine et les membranes cellulaires aient toutes les deux une charge nette négative, on retrouve fréquemment de l'actine accolée à la face interne de la membrane plasmique (Pollard & Korn, 1973; Lindberg & al, 1981; Small & L'Anganger, 1981). En plus de soutenir la membrane, cette actine corticale jouerait plusieurs rôles dans la motilité. Dans le cas des cellules à chromaffine, cette barrière d'actine empêche l'exocytose des granules de sécrétion. La stimulation de ces cellules induit la dépolymérisation locale de l'actine, ce qui permet le contact entre les vésicules et la membrane (Trifaro & al, 1992). L'actine jouerait en plus un rôle actif dans l'exocytose en formant des cages contractiles autour des vésicules qui

fusionnent avec la membrane plasmique (Segawa & al, 1989; Miyamoto & al, 1993).

Pour lier l'actine à la membrane il existe un certain nombre de protéines, dont la liste s'allonge de jour en jour. Certaines techniques ont cependant montré que l'actine pouvait aussi se lier directement aux lipides membranaires. En plus de vouloir confirmer l'existence de ce lien direct actine-lipides par une nouvelle approche, ce travail a pour but de montrer qu'une telle interaction peut jouer un rôle dans la cellule.

Dans la première partie de l'introduction, nous allons faire un survol des connaissances sur le cytosquelette afin de situer l'importance du lien actine-membrane. Nous résumerons dans une deuxième partie quelles sont les évidences qui supportent l'existence d'un lien direct entre l'actine et les lipides membranaires. Nous terminerons l'introduction en décrivant la technique d'analyse que nous avons choisie.

1.1- Généralités sur le cytosquelette

1.1.1- Définition et rôles du cytosquelette

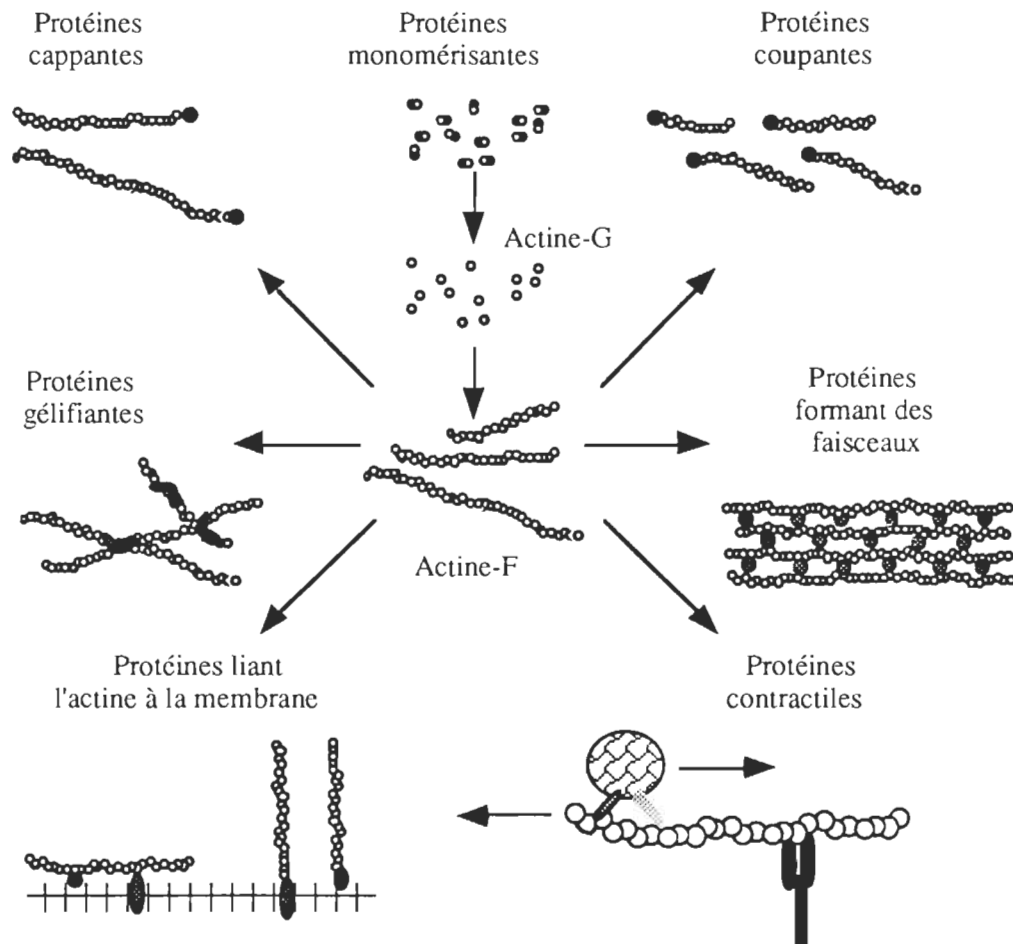
La plupart des auteurs s'entendent pour définir le cytosquelette comme étant un réseau intégré de polymères cytoplasmiques filamenteux, comprenant les microtubules, les microfilaments et les filaments intermédiaires ainsi que leurs protéines associées (Broekaert, 1993). Certains y ajoutent la matrice extracellulaire et les éléments structuraux du noyau. Il est reconnu comme étant à la base de l'architecture cellulaire, ce qui implique un rôle dans les mouvements cellulaires, dans le maintien de la forme des cellules, l'adhésion de la cellule avec la matrice extracellulaire et les cellules voisines. Il aurait aussi un rôle dans l'intégration des activités cellulaires en positionnant adéquatement ses diverses composantes (organites, protéines, ARN_m, particules). Certains auteurs prétendent que le cytosquelette pourrait aussi transférer de l'information de la membrane plasmique vers le noyau, pour influencer l'expression de certains gènes (Niggli & Burger, 1987).

Bien qu'elles contribuent toutes au maintien de la forme de la cellule, chaque composante du cytosquelette joue des rôles particuliers. Les microtubules interviennent dans le mouvement des cils et des flagelles et dans le mouvement des chromosomes. Les microfilaments d'actine participent à la contraction musculaire, au mouvement amiboïde, à la division cellulaire, à l'endocytose et à l'exocytose. Les filaments intermédiaires interviendraient surtout dans le positionnement d'organites (Goldman & Steinert, 1990). Certaines formes de motilité font intervenir deux composantes à la fois. C'est le cas de l'extension des filopodes (Goldberg & Burmeister, 1992), de la motilité des organites et des vésicules (Kuznetsov et al, 1992; Lillie & Brown, 1992) qui font intervenir les microtubules et les microfilaments.

L'actine est habituellement la composante du cytosquelette la plus abondante. Cette protéine de 43 kDa est présente dans toutes les cellules eucaryotes. L'actine se présente sous deux formes: l'actine monomérique (ou actine-G, pour actine globulaire) et l'actine filamenteuse (ou actine-F) qui est un homopolymère. Le diamètre du filament est de 7 nm et sa longueur variable. *In vitro* la polymérisation de l'actine-G en actine-F est induite par l'ajout de cations divalents (Mg^{++} , Ca^{++}) et monovalents (K^+).

Dans la cellule, l'actine interagit avec de nombreuses protéines accessoires. La figure 1 en schématise les principales classes. La plus connue, la myosine, hydrolyse l'ATP (adénosine triphosphate) pour déplacer le filament générant ainsi plusieurs mouvements cellulaires, dont la contraction musculaire. Les protéines accessoires permettent à l'actine de former des structures très diversifiées (microvillosités, fibres de stress, sarcomère, ...).

Figure 1. Classes de protéines accessoires liant l'actine (inspiré de Luna & Condeelis, 1990).



1.1.2- Interactions cytosquelette-membrane

a) Importance du lien cytosquelette-membrane

La membrane est une structure déformable constituée de deux feuillets opposés de phospholipides dans lesquels sont insérées des protéines. L'ensemble est mobile et fragile, d'où l'importance du soutien que lui apporte le cytosquelette (Jacobson, 1983), qui engendre une réduction importante de la diffusion latérale des lipides (Paller, 1993).

Le cytosquelette ne peut jouer son rôle s'il n'est pas arrimé à la membrane. C'est évident dans son rôle de soutien de la membrane et dans le déplacement de structures membranaires (cytocinèse, endocytose, motilité vésiculaire, positionnement d'organites), mais l'ancrage du cytosquelette à la membrane est tout aussi essentiel pour ses autres fonctions. Par exemple, au cours de la prophase, les microtubules astraux doivent se lier à la membrane afin de positionner correctement le fuseau mitotique. Dans les cellules musculaires, les microfilaments d'actine doivent être fixés à la membrane pour que leur glissement sur les filaments épais de myosine puisse contracter la cellule. Dans le mouvement amiboïde, les filaments d'actine doivent se lier à la membrane pour que le cytosquelette prenne appui sur le substrat (situé à la face extracellulaire de la membrane cellulaire), mais aussi pour déformer la membrane de la cellule lors du mouvement.

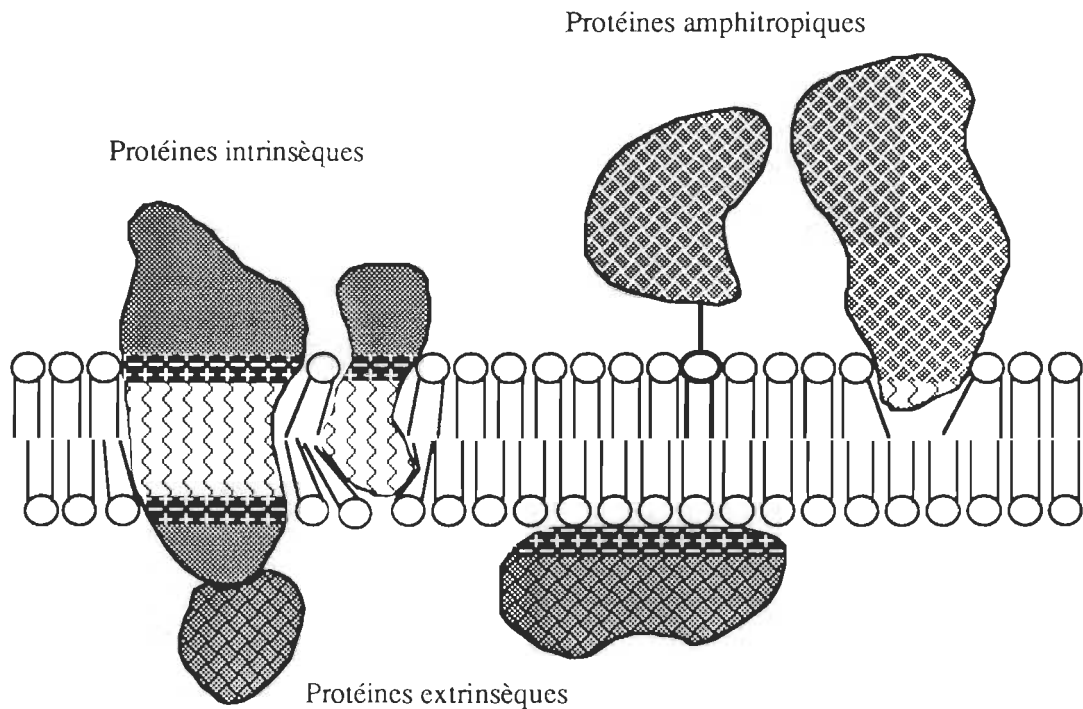
b) Mode de liaison des protéines avec la bicouche

Les membranes ne sont pas composées uniquement de lipides, mais aussi de protéines. Ces protéines se classent en trois catégories, selon leur mode de liaison avec la bicouche. Le figure 2 schématise ces trois catégories (Carraway, 1992).

Les protéines intrinsèques (ou intégrales) sont des protéines traversant la bicouche. La plupart d'entre elles exposent des domaines de part et d'autre de la bicouche. Les interactions qui lient ces protéines aux lipides sont de même nature que celles qui retiennent les lipides entre eux: des interactions polaires au niveau de la tête des lipides et des interactions hydrophobes au niveau des chaînes carbonées des lipides.

Comme on peut le voir à la figure 2, les protéines extrinsèques (ou périphériques) ne s'insèrent pas dans la bicouche. Elles sont retenues à la surface de la membrane, soit par des interactions électrostatiques avec la tête polaire des lipides, soit en interagissant avec les domaines extramembranaires d'une protéine intrinsèque.

Figure 2. Mode de liaison des protéines à la bicouche lipidique.



Finalement, les protéines amphitropiques sont des protéines qui se lient à la membrane sans avoir les caractéristiques des protéines intrinsèques ou extrinsèques. Cette catégorie regroupe les protéines liées de façon covalente à un lipide et celles dont seul un segment limité s'insère dans la membrane, comme l'illustre la figure 2.

Les protéines accessoires qui lient l'actine à la membrane peuvent utiliser ces trois modes de liaison. À titre d'exemple, la vinculine, la métavinculine et l' α -actinine sont des protéines intrinsèques puisqu'elles s'insèrent dans les membranes (Niggli & Gimona, 1993). Les myosines I sont pour leur part des protéines extrinsèques car elles se lient aux membranes par des liens électrostatiques, par leur portion N-terminale basique (Adams & Pollard, 1989; Hayden & al, 1990; Doberstein & Pollard, 1992; Li & Chantler, 1992). La taline a quant à elle recours aux interactions électrostatiques et hydrophobes pour se lier aux lipides membranaires (Heise & al, 1991). Les exemples de protéines amphitropiques sont peu nombreux, bien qu'il semble que quelques-unes soient associées au cytosquelette (Carraway, 1992).

c) Types de liaisons cytosquelette-membrane:

Nous avons vu à quel point le lien cytosquelette-membrane est essentiel, mais nous ignorons encore de quelles façons ses trois composantes polymériques (les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires) se lient à la bicouche. Bien que certaines études rapportent l'existence d'un lien direct entre ces polymères et la bicouche, le modèle le plus fréquemment rapporté implique leur liaison indirecte par l'entremise de protéines accessoires, qui sont pour la plupart des protéines extrinsèques (pour une revue: Niggli & Burger, 1987; Luna & Hitt, 1992; Stossel, 1993).

1- Liaison indirecte des polymères du cytosquelette à la bicouche

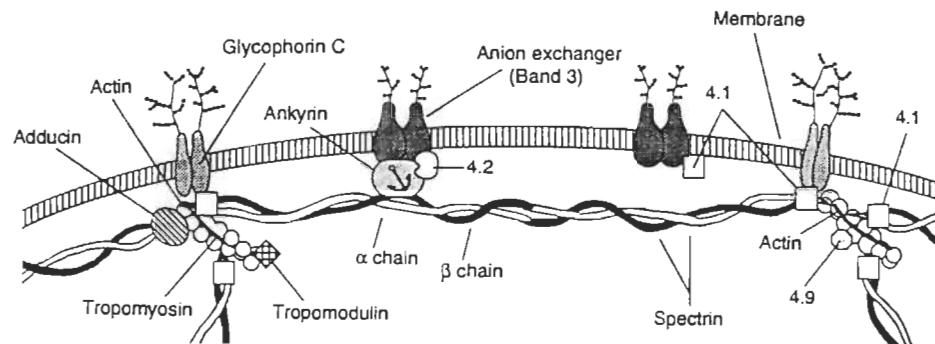
Le cytosquelette est composé de trois classes de polymères (microtubule, filament d'actine et filament intermédiaire). Chaque classe de polymère a généralement recours à des protéines qui lui sont spécifiques. Cependant, certaines protéines, comme la spectrine et l'ankyrine, peuvent lier les trois types de polymères à la membrane (Niggli & Burger, 1987).

Les protéines qui lient les microtubules aux membranes ont été peu étudiées. En plus de la spectrine et de l'ankyrine, certaines MAP (Microtubule Associated Proteins) jouent ce rôle (Niggli & Burger, 1987). Il en est de même pour les filaments intermédiaires. On sait qu'ils sont en contact avec la membrane au niveau des desmosomes et des hemidesmosomes, mais il semble que l'ancrage à la membrane passe par les microtubules ou par l'actine. La plectine, une des protéines associées des filaments intermédiaires, lierait certaines MAP et la spectrine (Jones & Green, 1991).

Une trentaine de protéines qui lient l'actine à la membrane ont déjà été identifiées. Le modèle le plus étudié est sans contredit celui de l'érythrocyte. La figure 3 nous montre que le cytosquelette du globule rouge est lié à la bicouche par deux protéines extrinsèques, l'ankyrine et la protéine 4.1. La première lie ensuite la bande 3 à la spectrine, alors que la seconde, en liant la spectrine, en

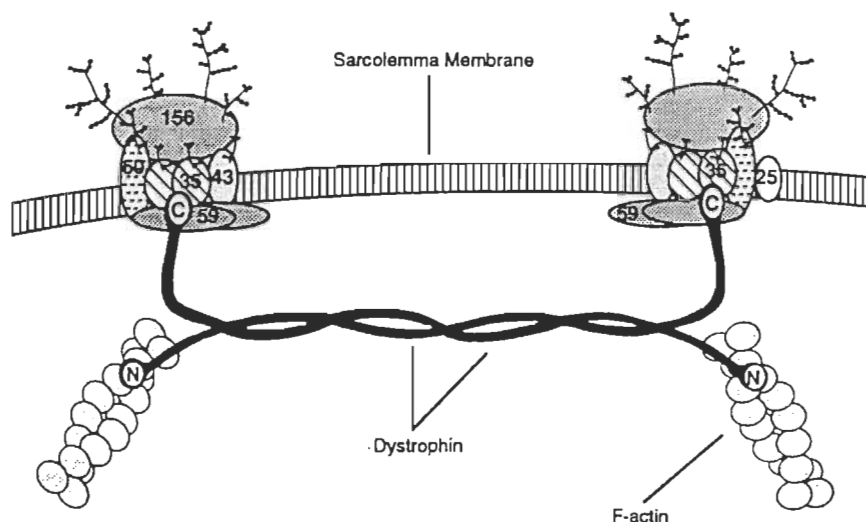
augmente l'affinité pour l'actine. S'ajoutent ensuite une demi-douzaine de protéines associées dont les interactions ne sont pas encore toutes connues.

Figure 3. Mode d'ancrage du cytosquelette à la membrane érythrocytaire (tiré de Luna & Hitt, 1992).



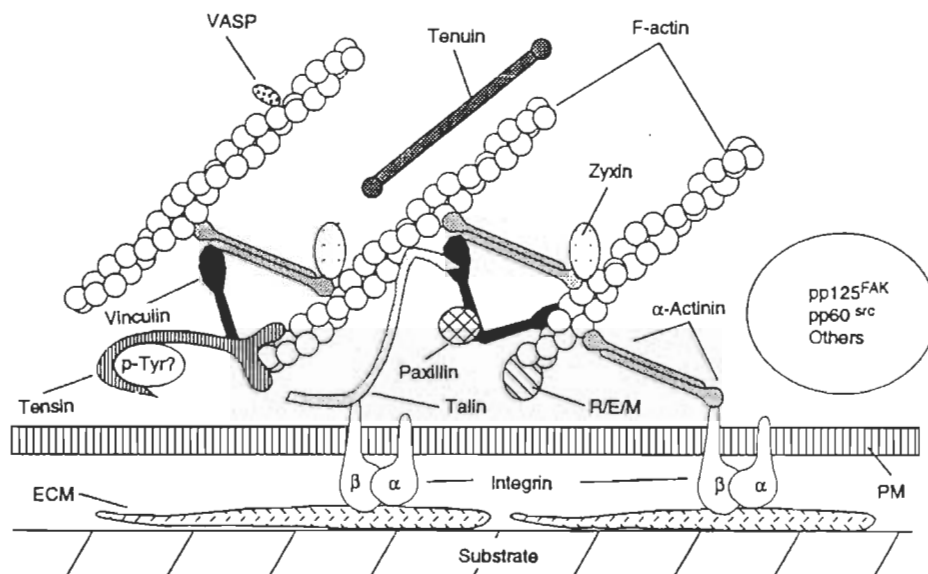
Un second modèle très étudié, illustré à la figure 4, implique la dystrophine. Cette protéine extrinsèque fait partie de la famille des spectrines. Dans le muscle, elle lie latéralement les faisceaux d'actine à la membrane. Elle fait partie d'un complexe de sept protéines associées à la membrane qui permettent au cytosquelette de se lier à la matrice extracellulaire. La dystrophine lierait aussi la taline (Senter & al, 1993).

Figure 4. Liaison de l'actine à la membrane par l'entremise de la dystrophine (tiré de Luna & Hitt, 1992).



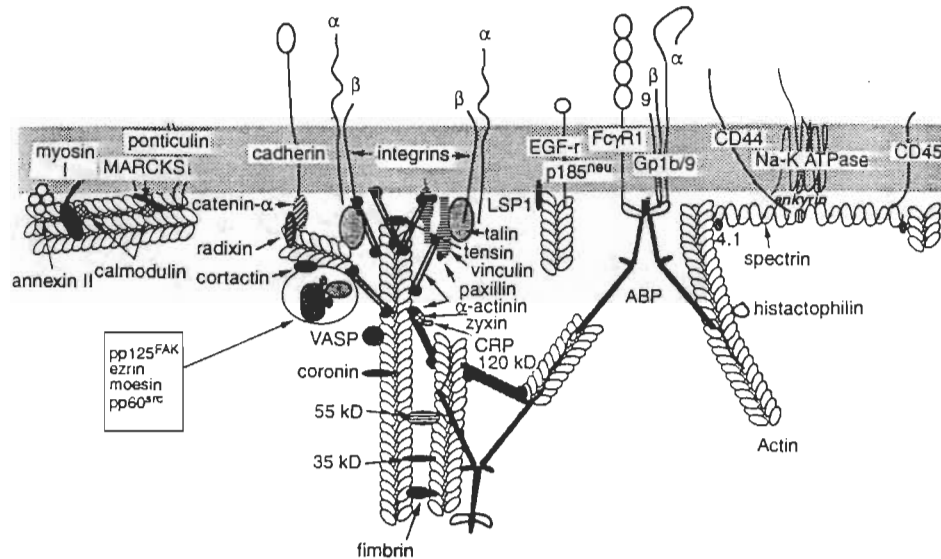
Un troisième modèle décrit la fixation de l'actine à la membrane aux sites d'adhésion de la cellule sur le substrat. La figure 5 nous montre que l'intégrine, une protéine intrinsèque, lierait diverses protéines associées à l'actine, dont l' α -actinine et la taline. La situation se complique lorsque l'on sait que la taline lie aussi la vinculine, qui lie elle-même la tensine, la paxilline et l' α -actinine, qui lie à son tour la zyxine... Pour compliquer la scène, de récents travaux ont montré que l' α -actinine, la taline et la vinculine lieraient elles-mêmes certains phospholipides (Niggli, 1993).

Figure 5. Mode d'ancrage du cytosquelette à la membrane au niveau des adhésions focales (tiré de Luna & Hitt, 1992).



Pour terminer ce tour d'horizon des liens indirects de l'actine à la membrane, la figure 6 nous présente le cas des cellules motiles. Ce modèle nous permet d'évaluer le grand nombre de protéines impliquées dans la liaison de l'actine à la membrane.

Figure 6. Mode d'ancrage de l'actine à la membrane des cellules en migration (tiré de Stossel, 1993).



2- Liaison directe des polymères du cytosquelette à la bicouche

Bien que la plupart des revues sur la liaison cytosquelette-membrane n'en fassent pas mention, certains auteurs ont rapporté des faits supportant une liaison directe des microtubules, des filaments intermédiaires et des filaments d'actine à la membrane. La plupart de ces travaux ont porté sur les microtubules. L'équipe de Klausner a montré que la tubuline s'insère dans la bicouche de vésicules artificielles lorsque ces dernières sont chauffées à la température de transition des lipides. Le complexe ainsi formé est stable et l'interaction ne semble pas électrostatique puisqu'elle est insensible aux cations monovalents ou divalents (Klausner & al, 1981; Kumar & al, 1981 et 1982). Parallèlement à ces travaux, une autre équipe a montré que la polymérisation des microtubules à l'intérieur de liposomes pouvaient les déformer (Hotani, 1990).

En plus de ces liens directs entre les microtubules et la bicouche, il existerait aussi une forme de tubuline membranaire, possédant la plupart des propriétés de la tubuline cytoplasmique (poids moléculaire, séquence d'acides aminés, réactivité aux anticorps), mais qui se distinguerait par sa plus grande résistance à la dénaturation thermique (pour une revue: Dentler, 1984; Stephens, 1986).

Pour ce qui est des filaments intermédiaires, la vimentine et la kératine se lieraient directement à la bicouche, et plus particulièrement aux phospholipides polaires (Jones & Green, 1991). Quant à la liaison directe de l'actine à la bicouche, nous en ferons l'objet de la deuxième partie de l'introduction car c'est l'objet de ce travail.

1.2- Interaction directe actine-lipides

La plupart des auteurs admettent que l'actine s'attache à la membrane par l'entremise de protéines accessoires. Rares sont ceux qui travaillent sur l'interaction actine-lipides. Nous rapporterons dans un premier temps les travaux portant sur l'interaction directe actine-lipides et, dans un deuxième temps, nous ferons un survol d'observations supportant ce mode de liaison.

1.2.1- Travaux sur l'interaction directe actine-lipides

La seule équipe qui s'est penchée sérieusement sur le sujet est celle du Dr Gicquaud. Son équipe a démontré l'existence d'une interaction directe entre l'actine et les lipides par diverses techniques: la microscopie électronique, la cosédimentation, l'augmentation de la perméabilité membranaire, la polarisation de fluorescence et la calorimétrie différentielle à balayage. Voici le résumé de l'ensemble de ces travaux.

a) Les liposomes, des vésicules de lipides purifiés, peuvent lier l'actine, qu'elle soit monomérique ou filamenteuse, d'une façon directe, spécifique et saturable.

L'interaction actine-phospholipides est directe puisqu'elle ne requiert pas la présence de protéines accessoires. Elle est spécifique car son interaction varie selon la nature des phospholipides utilisés. L'interaction est finalement saturable puisque la surface des liposomes semble être le facteur limitant la quantité d'actine liée par les liposomes (Laliberté & Gicquaud, 1988).

b) Les liposomes induisent la polymérisation de l'actine-G en actine-F.

Il a été démontré que les spectres de fluorescence de l'actine qui interagit avec les liposomes chargés positivement sont caractéristiques de la forme filamenteuse de l'actine, et cela même dans des conditions ioniques dépolymérisantes (Rioux & Gicquaud, 1985). Si les liposomes sont détruits par ajout de détergent, l'actine retourne à l'état monomérique (Laliberté & Gicquaud, 1988).

c) L'actine se dispose de façon ordonnée à la surface des liposomes.

Lorsque l'actine interagit avec les liposomes, elle se dispose à leur surface en filets ou en paracristaux, sur lesquels on peut observer une périodicité de 36 nm, qui correspond au pas de l'hélice que forme le filament d'actine (Rioux & Gicquaud, 1985).

d) L'interaction directe actine-phospholipides est favorisée par la présence de cations divalents, mais diminuée par la présence de cations monovalents.

Alors que les membranes chargées positivement ne requièrent aucun cation divalent pour lier l'actine, les membranes composées de lipides neutres ou négatifs requièrent quelques millimolaires de cations divalents pour interagir avec l'actine (St-Onge & Gicquaud, 1989). À cet effet le calcium est plus efficace que le magnésium (St-Onge, 1989). À l'inverse, les cations monovalents réduisent cette interaction (Rioux & Gicquaud, 1985; St-Onge & Gicquaud, 1989; Cermakian & al, 1992; Gicquaud, 1993).

Outre les travaux de Gicquaud, les articles qui traitent d'une interaction directe actine-lipides sont peu nombreux. Llerenas & Cid (1985) ont montré que l'actine rigidifiait les monocouches de phosphatidylcholine. Barmann & al (1992) ont montré l'interaction directe actine-lipides en analysant la dénaturation thermique de liposomes contenant de l'actine par calorimétrie différentielle à balayage. Ces auteurs ont par ailleurs constaté en microscopie optique que l'actine fluorescente se trouvait principalement à la surface de la bicouche.

L'équipe d'Utsumi a, dans un premier temps, remarqué qu'en incubant des homogénats de cellules avec des membranes, certaines protéines cytoplasmiques sont isolées avec les fractions membranaires (Utsumi & al, 1981). Le cholestérol réduirait cette interaction pour la plupart des protéines, mais pas pour l'actine (Okimasu & al, 1986). Ils ont aussi observé une interaction entre l'actine et des liposomes de DMPC par la même technique (Utsumi & al, 1982). Cette même équipe a dans un deuxième temps étudié l'interaction des protéines cytoplasmiques en les incubant avec des liposomes contenant un fluorophore. Lorsque les protéines interagissent avec ces membranes, une certaine quantité de fluorophore est libérée, plus particulièrement lorsque l'interaction se produit à la température de transition de la membrane (Weinstein & al, 1986). Les résultats obtenus avec cette technique ont montré que l'actine-F interagit directement avec les liposomes de DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) à toutes les températures, mais de façon plus marquée à la température de transition. Le cholestérol inhiberait cette interaction (Utsumi & al, 1982), ce qui vient contredire les résultats qu'ils ont précédemment obtenus. Cette inhibition a poussé les auteurs à conclure qu'une interaction directe entre l'actine et les lipides est peu probable dans la cellule en raison de la présence de cholestérol dans les membranes cellulaires et de la température à laquelle vivent les cellules. Ceci est à notre avis une conclusion erronée puisque leurs graphiques montrent clairement que l'actine induit, à température de la pièce, une hausse de perméabilité de près de la moitié de l'effet maximal qu'ils ont enregistré (Utsumi & al, 1982; Okimasu & al, 1986 et 1987). Notre équipe a, par la même technique, observé une interaction à température ambiante (St-Onge, 1989).

1.2.2- Autres observations supportant l'interaction directe actine-lipides

Les paracristaux d'actine observés par Gicquaud ont été utilisés par deux équipes qui tentaient de cristalliser l'actine dans le but d'en étudier la structure par diffraction des rayons-X (Ward & al, 1990; Taylor & Taylor, 1992). Les premiers ont conclu que les paracristaux, formés à la surface des monocouches sont produits par des forces électrostatiques entre la monocouche chargée positivement et l'actine chargée négativement. D'une part, un simple rinçage avec une solution de magnésium réduit grandement la quantité de filaments liés et, d'autre part, la pression de surface de la monocouche n'est pas affectée par la présence de l'actine (Ward & al. 1990). Taylor & Taylor (1992) affirment quant à eux que la monocouche et les charges positives sont essentielles à la formation de paracristaux. Selon ces auteurs, les paracristaux réguliers sont plus communs à la surface des monocouches composées des lipides à courte chaîne carbonée, donc plus fluides.

Deux équipes se sont intéressées à la polymérisation de l'actine à l'intérieur de liposomes (Miyata & Hotani, 1992; Cortese & al, 1989). En plus d'observer que la polymérisation était suffisante pour déformer la membrane des liposomes, ils ont remarqué que l'actine se trouvait principalement à proximité de la membrane.

Ostlund & al (1977) ont quant à eux montré que l'actine-F pouvait empêcher la sédimentation de granules de sécrétion, de mitochondries, de liposomes de phosphatidylcholine et même de billes de polymères. L'interaction avec les vésicules à l'état natif n'est pas inhibée par le magnésium ou le calcium (2 mM), le potassium (0,8 M), le DTT (5 mM), l'EGTA ou l'EDTA (1 mM), l'ATP (10 mM) ou par le traitement enzymatique des membranes à la trypsine ou à la phospholipase C. Les auteurs ont conclu qu'il s'agit d'une interaction lipophile puisque le traitement à la trypsine augmente l'interaction, mais que cette dernière se produit avec des lipides autres que les phospholipides, étant donné qu'elle est encore possible après la digestion à la phospholipase. Asch & al (1990), en tentant de caractériser quels lipides s'associent de manière non-covalente aux protéines cytoplasmiques, ont détecté que l'actine liait quelque

peu les lipides neutres, bien que l'incubation ait été faite en présence de 1,5 M de KCl.

Sanders (1983) a détecté la présence à la surface externe de membranes cellulaires d'une protéine antigéniquement semblable à l'actine. L'auteur conclut qu'il peut s'agir d'une forme membranaire de l'actine, d'actine provenant de cellules mortes liées à des récepteurs spécifiques ou bien d'une autre protéine que l'actine. Notons en terminant qu'une grande partie de l'actine présente sous la membrane de certaines cellules peut être facilement enlevée (Davies, 1984; Gert de Couet & al, 1984; Gruenstein & al, 1975). Une partie de cette actine faiblement liée pourrait tout simplement être adsorbée à la membrane par des interactions électrostatiques (St-Onge & Gicquaud, 1989).

1.3- Objectifs et choix de la technique

1.3.1- Problématique et objectif

Comme nous venons de le voir, de nombreuses techniques ont montré qu'une interaction directe existe entre les phospholipides et l'actine *in vitro*. Mais trois questions fondamentales restent encore sans réponse:

a) L'interaction directe actine-lipides se produit-elle dans la cellule?

On ne peut malheureusement pas répondre directement à cette première question puisqu'il nous faudrait éliminer des cellules toutes les protéines accessoires liant l'actine aux membranes. Bien qu'il soit possible d'éliminer par manipulation génétique quelques protéines, il est peu probable qu'une cellule puisse survivre sans ces protéines, qui interviennent dans des mécanismes aussi essentiels que l'endocytose et la division cellulaire. On doit donc se rabattre sur des expériences *in vitro*, et tenter d'imiter le mieux possible les conditions cellulaires. Pour répondre à la première question, nous devons nous efforcer de choisir judicieusement les divers paramètres expérimentaux: modèle de membrane, type de lipides, conditions ioniques, concentrations des lipides et de l'actine, pH, température. Jusqu'ici, les résultats ont montré qu'il y a une

interaction directe de l'actine avec des lipides retrouvés en grande quantité dans les membranes cellulaires, les phosphatidylcholines, aux températures, aux pH physiologiques et aux concentrations physiologiques de magnésium. Le seul point discutable concerne une inhibition par le potassium: selon la méthode utilisée, on ne détecte qu'une interaction réduite (ou nulle) aux concentrations physiologiques de potassium (St-Onge & Gicquaud, 1989; Cermakian & al, 1992; Gicquaud, 1993).

b) L'actine qui interagit avec les lipides est-elle dans un état fonctionnel?

Toutes les tentatives de décorer l'actine interagissant avec les liposomes avec l'HMM, un fragment enzymatique de la myosine, furent vaines (Rioux & Gicquaud, 1985; N. Cermakian, communication personnelle). Les récents résultats obtenus en calorimétrie différentielle montrent que l'actine qui interagit avec les liposomes est dans un état conformationnel différent: il y a disparition du pic de dénaturation de l'actine lorsqu'elle est en présence de liposomes. La dénaturation de l'actine requiert donc moins d'énergie lorsqu'elle est en présence de liposomes. On peut donc se demander si l'actine est encore fonctionnelle lorsqu'elle interagit avec les liposomes.

c) Cette interaction est-elle suffisamment importante pour jouer un rôle *in vivo*?

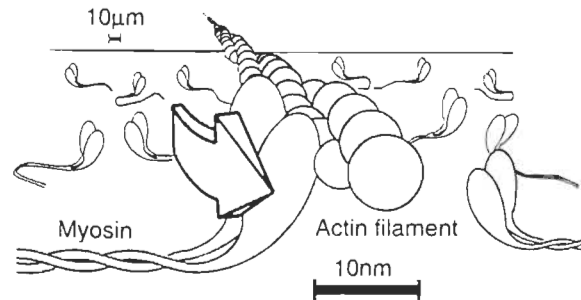
Quant à cette troisième question, aucun résultat ne suggère que l'interaction directe actine-lipides soit suffisamment forte pour jouer un rôle *in vivo*.

L'objectif de ce projet de recherche est de démontrer que l'interaction directe actine-lipides peut jouer un rôle *in vivo*.

1.3.2- Choix de la technique

Pour atteindre cet objectif, nous aurons recours à la technique des moteurs à l'actomyosine de Kron. Cette technique permet d'observer le déplacement de filaments d'actine fluorescents sur une surface enduite de myosine. Nous avons

Figure 7. Interaction de l'actine avec une surface enduite de myosine (tirée de Yanagida & al, 1993).



L'actine utilisée peut être de n'importe quelle origine, sans que cela n'affecte le déplacement. Par contre, la vitesse et les conditions nécessaires à la motilité changent beaucoup selon le type de myosine utilisée, autant selon le type de préparation (myosine I; myosine II en bâtonnets, en dimères, en monomères, fragment HMM, fragment S1), que sa provenance (cellules musculaires lisses, squelettiques ou cardiaques; cellules non-musculaires; cellules végétales; protozoaires). Pour une revue théorique, consulter Higashi-Fujime (1991) et pour une revue plus technique Kron & al (1991). Les moteurs à l'actomyosine ont entre autres permis de constater que la tête de la myosine est suffisante pour générer le mouvement de l'actine (Toyoshima & al, 1987). Les toutes dernières applications de cette technique ont permis de mesurer la force, en piconewtons, générée par l'hydrolyse de chaque molécule d'ATP (Yanagida & al, 1993).

modifié cette technique en y introduisant des liposomes ayant préalablement interagi avec l'actine. Si nous arrivons à observer le déplacement des liposomes dans ces préparations, nous serons en mesure de conclure que l'actine qui interagit avec les lipides est dans un état fonctionnel, et que l'interaction directe actine-lipide est suffisamment forte pour jouer un rôle actif *in vivo*.

L'avantage premier de cette technique est que l'on peut contrôler toutes les conditions (ioniques, pH, température, ...). Cette technique est donc tout à fait appropriée à notre projet puisque l'on peut ainsi mimer les conditions cellulaires. Ceci nous permettra de vérifier si l'interaction actine-lipides est suffisamment importante pour jouer un rôle *in vivo*.

1.3.3- Les moteurs à l'actomyosine de Kron

Deux équipes, celle de Kron & Spudich (Stanford University) et celle de Honda, Nagashima & Asakura (du Japon) ont simultanément mis au point en 1986 la technique grâce à laquelle il est possible de voir directement des filaments d'actine glisser sur une surface de myosine. Les moteurs à l'actomyosine consistent à mettre sur une surface enduite de myosine des filaments d'actine préalablement rendus fluorescents grâce à la rhodamine-phalloïdine. En rinçant la surface avec une solution exempte d'ATP, on ne garde que les filaments d'actine liés à la myosine. Grâce à la microscopie à fluorescence, il est alors possible de voir chaque filament sur toute sa longueur. Si on ajoute de l'ATP à cette préparation, les filaments se mettent à silloner la surface, comme le schématise la figure 7. La vitesse de ces déplacements est de 4 à 6 $\mu\text{m/s}$, ce qui est du même ordre de grandeur que la vitesse de glissement des filaments d'actine dans le muscle. Il est alors possible de perfuser cette préparation avec des solutions pour étudier l'effet des diverses conditions expérimentales sur le déplacement des filaments d'actine: concentration d'ATP, d'ADP, de phosphate inorganique, d'ions, du pH, de la température, de la viscosité (pour une revue, voir Homsher & al, 1992).

2- MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.0- Généralités

Les protocoles employés pour réaliser cette étude ont pour la plupart été tirés de *Methods in Enzymology* #196, p.399-416 (Kron et al, 1991). Un point important de cet article doit être souligné: la qualité des préparations de myosine est critique pour le fonctionnement des moteurs. Ces préparations sont très sensibles à l'oxydation, et il est recommandé d'utiliser un minimum de 2 mM de dithiotreitol, un agent anti-oxydant, dans toutes les solutions.

L'eau utilisée était dans un premier temps déminéralisée, distillée sur verre (Corning) puis filtrée sur colonne échangeuse d'ions (NANOpure, Sybron/Barnstead, Boston, MA) à une résistivité supérieure à 12 mégohm-cm.

Les centrifugations ont été effectuées grâce aux trois appareils suivants: ultracentrifugeuse Beckman L8-70MR; rotors 70 Ti et 70.1 Ti (Beckman, Palo Alto, CA); centrifugeuse Sorvall RC-3; rotor HG-4L (Ivan Sorvall, CT); centrifugeuse à tubes Eppendorf 5415C (Eppendorf, Germany).

La liste suivante énumère l'ensemble des produits chimiques utilisés ainsi que le numéro de catalogue du fournisseur.

Aldrich (Milwaukee, WI)

MgCl₂: Magnesium chloride hexahydrate, #24, 696-4.

Anachemia (Montréal, Québec)

Chloroforme, GD-2280.

Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)

DOPC: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, # 850375.

DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, # 850365.

Eastman Kodak (Rochester, NY)

Carboxyfluoresceïne: 5(6) Carboxyfluorescein, #9953.

Fisher Scientific (Montréal, Québec)

CaCl₂: Calcium chloride anhydrous, C-77.

KCl: Potassium chloride, P-4504.

NaHCO₃: Sodium bicarbonate, S-233.

Tris (THAM): Tris(hydroxymethyle)aminomethane, T-3958.

Mecalab (Montréal, Québec)

Collodion: 0,5% dans l'isoamylacétate, #6040. Pour usage, diluer à 0,025%.

Sigma (St-Louis, MO)

ATP: Adenosine 5'-triphosphate disodium salt, A-5394.

Azide: Sodium azide, S-2002.

BSA: Albumine, Bovine fraction V, A-4503.

Chymotrypsine: α -chymotrypsin N-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone (TLCK) treated, 50 units/mg solid, 54 units/mg protein, C-3142.

DTT: DL-Dithiotreitol, D-0632.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, ED.

EGTA: Ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid, E-4378.

Histidine-HCl: L-Histidine hydrochloride, H-8125.

Imidazole-HCl: Imidazole hydrochloride, I-3386.

Mercaptoethanol: 2-Mercaptoethanol, M-6250

MC: Methylcellulose, M-7140.

NEM: N-ethylmaleimide, E-3876.

PMSE: Phenylmethyl-sulfonyl fluoride, P-2626.

2.1- Préparation de l'actine

Tableau 1
Composition des tampons-G.

	tampon G	tampon G ACA
Tris-HCl pH 8,0	2 mM	2 mM
ATP	0,2 mM	0,2 mM
CaCl ₂	0,2 mM	0,2 mM
β -mercaptoéthanol	0,5 mM	0,5 mM
Azide de sodium	0,01 %	0,01 %
KCl	-	20 mM

2.1.1- Préparation de l'actine à partir de la poudre acétonique

La préparation de la poudre acétonique est la même que celle décrite par Pigeon (1992). L'extraction de l'actine est basée sur la méthode de Spudich & Watt (1971), telle que modifiée par Nonomura et al (1975). Brièvement, l'actine est extraite de la poudre acétonique sous forme monomérique avec du tampon G (voir le tableau 1). Le résidu insoluble est alors éliminé par une centrifugation de 60 min. à 120 000 g (40 000 rpm avec une ultracentrifugeuse Beckman L8-70M, rotor 70 Ti ou 70.1 Ti). On induit la polymérisation de l'actine en ajoutant au surnageant du KCl et du MgCl₂ (concentrations finales respectives de 100 mM et 2 mM). L'actine-F est recueillie par ultracentrifugation (120 min. à 40 000 rpm). Les culots sont alors homogénéisés puis dialysés 48 heures avec au moins deux changements de tampon-G afin de dépolymériser à nouveau l'actine. Cette solution d'actine-G est ultracentrifugée une dernière fois (120 min. à 40 000 rpm) pour éliminer l'actine dénaturée et conservée sur glace au maximum une semaine.

2.1.2- Purification de l'actine

La chromatographie liquide d'exclusion de l'actine est la même que celle décrite par Pigeon (1992). Cette méthode est basée sur celle de Fowler et Bennett (1984). Brièvement, un maximum de 10 ml (ou 10 mg) d'actine dans le tampon G sont déposés sur une colonne à chromatographie d'un litre (Pharmacia Fine Chemicals, Suède) d'Ultrogel ACA-44 (LKB-2204-440, LKB Products, Suède), suivis d'environ 3 ml de tampon G. Le débit d'élution est de 0,5 ml/min. contre la gravité. L'éluant utilisé est le tampon G ACA (voir le tableau 1). Des fractions de 4 ml sont recueillies et le pic d'élution de l'actine, déterminé par spectrophotométrie à 290 nm, se trouve environ à 200 ml. Les cinq fractions les plus concentrées sont réunies puis dosées.

Pour s'assurer de la pureté de l'actine, nous avons effectué des gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; selon les méthodes décrites par Pigeon, 1992) qui ont montré que la chromatographie de l'actine élimine la majeure partie des contaminants. Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par Pigeon (1992) et par Pardce & Spudich (1982), en ce sens que la purification de l'actine par chromatographie élimine les bandes qui ne sont pas de l'actine. L'absence de contaminants est particulièrement importante dans le cadre de cette étude. En effet, si seule l'actine non-chromatographiée avait fait bouger des liposomes, ou si l'électrophorèse avait révélé la présence de protéines liant l'actine aux phospholipides, aucune conclusion valable n'aurait pu être tirée. La plupart des travaux effectués sur l'interaction de l'actine avec les membranes font recours à ce type de chromatographie pour s'assurer de l'absence de contaminants (Chia et al, 1991).

2.1.2- Préparation de l'actine fluorescente

Tableau 2
Composition du tampon AB.

Imidazole-HCl	pH 7,4	25 mM
KCl		25 mM
MgCl ₂		4 mM
EGTA		1 mM
DTT		1 mM

Pour être visibles, les filaments d'actine doivent être rendus fluorescents à l'aide de la rhodamine-phalloïdine selon le protocole de Kron et al (1991), comme suit:

1-L'actine est d'abord polymérisée plus d'une heure à une concentration de 1 mg/ml et à température de la pièce, dans le tampon AB auquel on a ajouté 0,2 mM d'ATP.

2-Après avoir rincé soigneusement une seringue Hamilton de 50 µl avec du méthanol, on dépose à l'obscurité 94 µl d'une solution à 3,3 µM de rhodamine-phalloïdine (dans le méthanol) dans un tube Eppendorf opaque. Le méthanol est alors évaporé sous un vide partiel 20 à 30 minutes, puis le culot est dissous avec 2 µl d'éthanol et 290 µl de tampon AB.

3-On ajoute à cette solution de rhodamine-phalloïdine 10 µl de la solution d'actine-F à 1 mg/ml. Après avoir été bien agité, ce mélange est incubé à la température de la pièce une nuit. Cette solution mère, à 33,3 µg/ml d'actine fluorescente, doit idéalement être diluée à environ 0,25 µg/ml avant de l'utiliser dans les moteurs à l'actomyosine. Cette solution diluée d'actine fluorescente perd son efficacité après une semaine, tandis que la solution mère peut rester fluorescente plus d'un an.

2.2- Purification de la myosine

Ce protocole est inspiré des protocoles de Kron & al (1991), de Hynes & al (1987) ainsi que de Margossian & al (1982). La préparation de la myosine est l'étape critique de la réussite des moteurs à l'actomyosine. On doit apporter une attention particulière aux détails suivants:

1-la présence d'au moins 1 mM de DTT dans toutes les solutions;

2-l'utilisation d'eau exclusivement nanopure autant pour la préparation des solutions que pour le rinçage des contenants et des outils (on doit à cet effet préparer au-moins 25 litres d'eau nanopure);

3-l'ajout d'un tampon histidine 100 mM pH 6,8 à la solution pour les culots.

4-le rinçage du hache viande avec une solution d'EDTA 0,02 M pH 7,0;

5-chaque étape doit se dérouler en chambre froide à 4°C.

Tableau 3

Composition des solutions pour la préparation de la myosine.

	Extraction	Précipitation	Dissolution	Culots	Conservation
KCl	0,3 M	-	2,4 M	1,2 M	0,6 M
DTT	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Histidine pH 6,8	50 mM	-	100 mM	100 mM	-
ATP	1 mM	-	-	-	-
Imidazole- HCl pH 6,8	-	-	-	-	25 mM

1-Après avoir tué, dépecé et éviscéré un lapin, le laisser environ 15 minutes enveloppé d'une serviette humide (eau nanopure froide) au congélateur.

2-À environ 75 g de muscle de lapin haché, ajouter 3 volumes de solution d'extraction (à laquelle l'ATP n'a été ajouté qu'à la dernière minute et dont le pH a été ajusté). Passez le tout au mélangeur de 30 à 60 secondes. Agiter pendant 10 min. avec un agitateur magnétique.

3-Arrêter l'extraction en ajoutant trois volumes de solution de précipitation. Filtrer immédiatement sur de la gaze et recueillir le filtrat.

4-Précipiter une portion du filtrat en y ajoutant neuf volumes de solution de précipitation. Laisser sédimenter trois heures. Décanter sans resuspendre avec un siphon et centrifuger les quatre litres du fond (18 minutes, 5000 rpm à 5°C, centrifugeuse Sorvall RC-3, rotor HG-4L).

5-Éliminer le gras du surnageant en l'aspirant avec une trompe à vide. Jeter le surnageant et dissoudre les culots en y ajoutant un volume précis (40 ml, par exemple) de solution de dissolution.

6-Diluer graduellement ces culots dissous avec la solution de précipitation pour obtenir une concentration finale de 0,28 M de KCl. On peut ajouter à cette étape 1 mM d'ATP pour réduire les liens rigor d'actine-myosine. Centrifuger 15 min. à 120 000 g à 5°C (45 000 rpm avec une ultracentrifugeuse Beckman L8-70M, rotor 70 Ti ou 70.1 Ti).

7-Diluer graduellement le surnageant en ajoutant 8,3 volumes de solution de précipitation. Laisser polymériser la myosine en bâtonnets plus de 45 minutes puis centrifuger (18 minutes, 5000 rpm).

8-Répéter les étapes 5, 6 et 7. À l'étape 7, il est souhaitable de jeter une partie du surnageant pour n'avoir ensuite plus qu'un seul culot de myosine.

9-Dissoudre doucement le culot de myosine, dans un petit volume (3 à 5 ml) de solution pour les culots. Ultracentrifuger 60 minutes à 160 000 g (46 000 rpm, Beckman L8-70M, rotor 70 Ti ou 70.1 Ti).

10-Doser le surnageant de myosine ($[mg/ml] = A_{280}/0,53$). Ces préparations contenaient en moyenne 15 mg/ml de myosine. Pour conserver au congélateur, ajouter à la myosine un volume égal de glycérol. Pour éliminer les bulles d'air

(dont l'effet oxydant est indésirable), procéder à une brève centrifugation de la solution avant de remplir à ras bord les tubes Eppendorf. La myosine peut ainsi se conserver sur glace plusieurs mois (Kron & al, 1991). On récupère ensuite la myosine en diluant la préparation pour faire précipiter les bâtonnets.

2.2.1- Préparation de l'HMM

Pour ces préparations, nous avons choisi d'utiliser le fragment HMM (Heavy Meromyosin) de la myosine parce que le taux de réussite des moteurs est plus grand avec l'HMM qu'avec la myosine en bâtonnets ou en solution. Ce protocole est celui décrit par Kron & al (1991).

Tableau 4
Composition des solutions pour la préparation de l'HMM.

	BED	2xCHB
NaHCO ₃ pH 7,0	0,1 mM	-
EGTA	0,1 mM	-
DIT	1 mM	10 mM
Imidazole-HCl pH 7,0	-	20 mM
KCl	-	1 M
MgCl ₂	-	4 mM

1-Ajouter neuf volumes de solution BED à 10 mg de myosine, incuber sur glace plus de 10 minutes pour permettre la formation de bâtonnets, puis centrifuger à basse vitesse à 4°C pendant 10 min. (13 000 rpm avec une centrifugeuse Beckman L8-70M).

2-Dissoudre le culot obtenu avec 333 µl de 2xCHB et 333 µl de BED à température de la pièce.

3-Ajouter 8,4 μ l d' α -chymotrypsine-TLCK-treated à 1 mg/ml dans l'eau. Agiter doucement et incuber de 7,5 à 10 minutes à 25°C. La solution de chymotrypsine doit être fraîche du jour.

4-Arrêter la digestion en ajoutant 6 ml de solution d'arrêt (BED + 3 mM $MgCl_2$ + 0,1 mM fluorure de phénylméthyl-sulfonyl, PMSF) puis incuber plus d'une heure sur glace. Il est recommandé de faire une solution mère de PMSF 0,2 M dans l'éthanol.

5-Centrifuger 25 min. à 4°C (50 000 rpm).

6-Doser le surnageant ($[mg/ml] = A_{280}/0,6$), en moyenne à 0,3 mg/ml (pur à 90 % selon Kron et al, 1991). Conservé sur glace, l'HMM reste fonctionnelle de trois à cinq jours. Nous avons cependant toujours utilisé de l'HMM frais du jour, et sans autre dilution.

2.2.2- Préparation de l'HMM-NEM

Le protocole d'inactivation de la myosine par le N-éthylmaleimide (NEM) a été tiré de Sheetz & Spudich (1983) ainsi que de Warshaw et al (1990). Il consiste à incuber la myosine (dans ce cas une préparation de HMM) avec 1 mM de NEM une heure, sur glace. La réaction est ensuite arrêtée en ajoutant 25 mM de DTT. La préparation est utilisée le jour-même sans autre dilution.

2.3- Préparation des liposomes fluorescents

Nous avons étudié l'interaction de l'actine avec des liposomes de deux compositions différentes: des liposomes composés de DSPC, et des liposomes composés de DOPC. La préparation des liposomes est basée sur la méthode de Bally et al (1988). Ces liposomes ont été rendus fluorescents par encapsulation de carboxyfluorescéine à 10^{-5} M. Cette concentration a été choisie après avoir constaté que les liposomes sont suffisamment fluorescents pour être observés assez longtemps, sans toutefois l'être trop pour endommager la caméra. Des

expériences ont aussi été faites pour s'assurer que la présence d'une telle concentration de carboxyfluorescéine ne perturbe pas le déplacement des liposomes ou des filaments d'actine.

1-Dans un ballon à joint rodé, dissoudre 20 mg de DSPC (ou DOPC) dans 5 ml de chloroforme. Après avoir ajouté quelques billes de verre dans le ballon, évaporer le solvant sous vide (Rotavapor R110 Büchi, Brinkmann Instruments, Rexdale, Ontario).

2-Poursuivre l'évaporation sous vide poussé plus d'une heure (Two Stage High Vacuum Pump E2M8, Edwards, Sussex, England). L'évaporation du solvant a été effectuée sous atmosphère d'azote pour éviter l'oxydation du DOPC.

3-Resuspendre les lipides dans 5 ml de tampon AB contenant 10^{-5} M de carboxyfluorescéine.

4-Congeler la suspension en la plongeant dans l'azote liquide (en prenant soin de choisir un tube résistant au gel).

5-Dégeler la préparation en plongeant le tube dans un bain à 70°C (température qui est au-dessus du point de transition des phospholipides utilisés). Pour obtenir des liposomes légèrement plus gros, dégelier la préparation graduellement en la laissant à température de la pièce.

6-Agiter vigoureusement la préparation à l'aide d'un vortex.

7-Répéter les étapes 4, 5 et 6 deux autres fois.

8-Procéder à l'extrusion (The Extruder, Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, Canada) en utilisant deux filtres de polycarbonate (pores de 8.0 μ m, Nucleopore Corp., Toronto, Ontario). La filtration est facilitée si l'appareil est plongé dans un bain à 70°C. Cette étape est facultative.

9-Éliminer la carboxyfluorescéine non-encapsulée en procédant à trois cycles de centrifugation/resuspension dans le tampon AB (ultracentrifugation 10 min à 40 000 rpm ou 20 minutes avec une centrifugeuse de table). Lors de la dernière resuspension, prendre soin de resuspendre les liposomes dans 5 ml de

tampon AB afin d'obtenir une concentration approximative de 4 mg/ml de lipides. Les liposomes ainsi préparés sont conservés au plus une semaine au réfrigérateur.

Grâce à la microscopie à fluorescence, nous avons pu remarquer que les liposomes ainsi obtenus sont sphériques et de taille variable. Les liposomes de DSPC ont une taille moyenne de 3 à 5 μm . Les liposomes de DOPC sont habituellement de plus petite taille (1 à 3 μm). De façon générale, la taille des liposomes diminue avec le nombre d'extrusions, indépendamment de la taille des pores des filtres. La taille des liposomes a aussi été mesurée à l'aide d'un autocorrélateur (Computing Autocorrelator model TC-100, NiComp Instruments, CA). Avec cette méthode, la taille des liposomes de DOPC est en moyenne de 3,14 μm , tandis que les liposomes de DSPC semblent former des agrégats d'une taille supérieure à 10 μm (limite supérieure de la résolution de l'appareil).

2.4- Les mélanges actine-liposomes

Tableau 5
Composition des solutions AB 3x.

AB 3x KCl=0		AB 3x MgCl ₂ =0	
Imidazole-HCl pH 7,4	75 mM	75 mM	75 mM
KCl	- - -	75 mM	
MgCl ₂	12 mM	- - -	
EGTA	3 mM	3 mM	
DTT	3 mM	3 mM	

Les mélanges d'actine-liposomes contenaient en général 1 mg/ml de liposomes fluorescents (DSPC ou DOPC) et 1 mg/ml d'actine (chromatographiée ou non). 250 μl d'une solution de liposomes fluorescents à 4 mg/ml sont sédimentés (5 minutes à vitesse maximale sur une centrifugeuse à tubes

Eppendorf). Après avoir enlevé le surnageant, on resuspend le culot de liposomes dans 333 μ l de tampon AB 3x (sans KCl ou sans $MgCl_2$, selon le cas). On ajoute alors des quantités précises de KCl et/ou de $MgCl_2$ pour atteindre la condition ionique choisie. Après avoir bien agité la préparation, on ajoute 1 mg d'actine dans le tampon G et on complète à 1 ml avec de l'eau nanopure. Le mélange est finalement agité au vortex et conservé au réfrigérateur au plus une semaine. Ces préparations semblent très stables puisque nous avons pu observer le mouvement de liposomes autant après 5 minutes qu'après deux mois d'incubation. Le fait de resuspendre ces préparations juste avant de les perfuser dans les moteurs n'affecte en rien la motilité des liposomes. L'effet du tampon G a aussi été vérifié. Dans ce cas, c'est avec du tampon-G que les liposomes ont été resuspendus et que la préparation a été complétée à 1 ml.

Certaines préparations ont aussi été effectuées avec de l'actine déjà polymérisée, plutôt qu'avec de l'actine-G. Dans ce cas, l'actine a été polymérisée plus d'une heure à température de la pièce dans le tampon AB-ATP (voir la préparation de l'actine fluorescente). Ces mélanges actine-F-liposomes ont été effectués en prenant soin de respecter les conditions ioniques standards (tampon AB) et les concentrations finales d'actine et de liposomes (1 mg/ml dans les deux cas).

Pour ce qui est des préparations de liposomes contenant de l'actine fluorescente, une solution d'actine fluorescente à 1 mg/ml a d'abord été préparée comme suit: 500 μ l d'actine chromatographiée (polymérisée à 1 mg/ml dans le tampon AB-ATP) ont été déposés dans un tube Eppendorf dans laquelle on a évaporé 500 μ l de rhodamine-phalloïdine. 100 μ l de cette solution ont été ajoutés à 50 μ l d'un mélange standard d'actine-liposomes. Les concentrations finales étaient 1 mg/ml d'actine et 0,67 mg/ml de liposomes fluorescents de DSPC. Le ratio molaire actine-G:rhodamine-phalloïdine était de 7:1.

Le tableau suivant dresse la liste des conditions ioniques testées.

Tableau 6
Conditions ioniques des mélanges actine-liposomes.

Effet du potassium	
[KCl]	[MgCl ₂]
m M	m M

0	4
1	4
5	4
10	4
15	4
20	4
25	4
30	4
35	4
40	4
45	4
50	4
70	4
80	4
90	4

Effet du magnésium	
[MgCl ₂]	[KCl]
m M	m M

0	25
0,5	25
1	25
2	25
3	25
4	25
10	25
20	25

Effet du tampon-G	
[MgCl ₂]	[KCl]
m M	m M

0	0
---	---

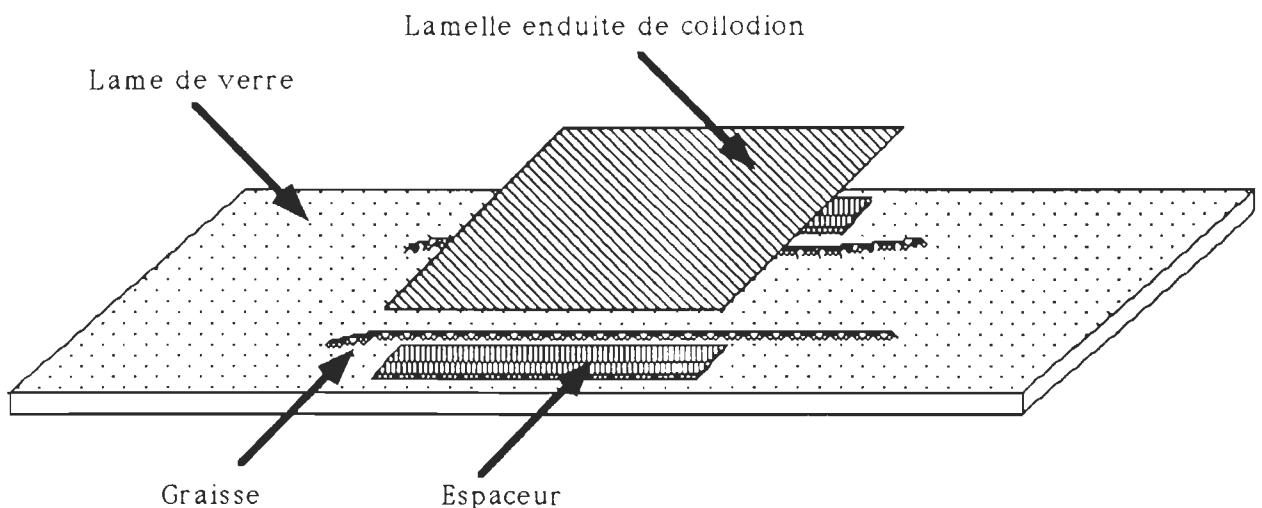
2.5- Préparation des moteurs à l'actomyosine de Kron

2.5.1- Confection de la lame à puits

La figure 8 nous montre le montage d'une lame à puits. Il s'agit d'une lamelle enduite de collodion déposée sur des espaceurs de façon à ce qu'il y ait un espace entre la lame et la lamelle. Pour rendre ce volume plus étanche on dépose deux lignes de graisse (à l'aide d'une seringue) entre les espaceurs, qui sont faits avec des lamelles taillées.

Avec un tel montage, il est possible d'observer la préparation au microscope avec un objectif à immersion à l'huile. On peut lier la myosine à la surface de la lamelle sans empêcher son interaction avec l'actine et changer la solution présente entre la lame et la lamelle à volonté, tout en gardant en place l'actine et la myosine. De toutes les surfaces qui peuvent lier la myosine sans perturber l'interaction avec l'actine, c'est le collodion (nitrocellulose) qui donne les meilleurs résultats. Le collodion lie beaucoup mieux la myosine que le verre nettoyé à l'alcool et sa surface est sans bavure, contrairement à d'autres produits comme le sigmacote.

Figure 8. Schéma d'une lame à puits.



Il a par ailleurs été démontré que les filaments d'actine se déplacent plus rapidement sur une surface de HMM liés par le collodion que par le sigmacote (Higashi-Fujime, 1991). La nature des liens entre la myosine et ces surfaces est encore inconnue (Higashi-Fujime, 1991).

Pour enduire des lamelles de collodion, la méthode la plus simple est la suivante:

1-Faire adhérer trois lamelles de 22 x 22 mm sur une lame de verre propre en les déposant sur une petite goutte d'eau.

2-Déposer une goutte de collodion (0,025% dans de l'amylacétate) sur chaque lamelle et l'y étendre à l'aide d'une pipette Pasteur.

3-Laissez sécher les lamelles en plaçant la lame à 45° pour permettre au surplus de collodion de s'égoutter.

4-Exposer les lamelles deux jours à une lumière blanche intense afin de réduire la fluorescence du collodion.

2.5.2- Les perfusions

Lorsqu'il n'est pas nécessaire d'observer la préparation au microscope, c'est le cas des premières perfusions, on peut perfuser les solutions en plaçant la lame à un angle de 45°. De cette façon, lorsqu'on dépose une goutte de solution elle glisse d'elle-même dans l'espace entre la lame et la lamelle, comme le montre la figure 9.

Lorsque la lame est sur la platine du microscope, on aspire graduellement la solution présente sous la lamelle avec un papier buvard, tout en remplaçant ce volume par la nouvelle solution, de l'autre côté de la lamelle, comme le montre la figure 10.

Figure 9. La perfusion à 45°.

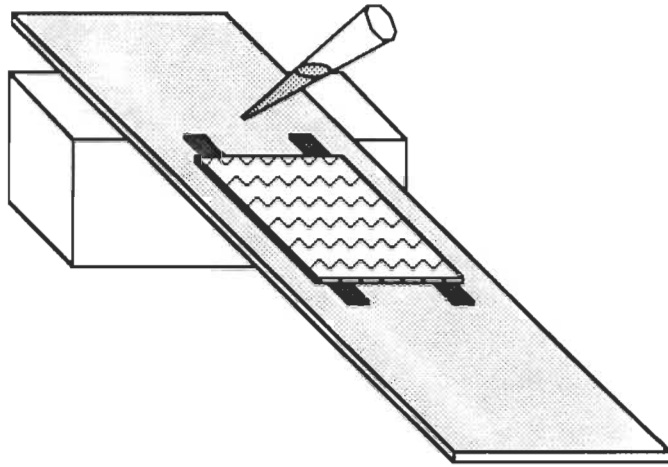
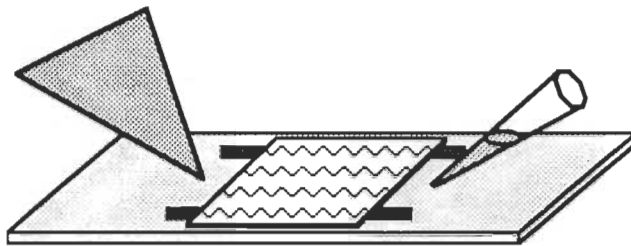


Figure 10. La perfusion à l'horizontale.



2.5.3- Conditions standards employées dans nos moteurs à l'actomyosine

Les solutions d'HMM et de motilité sont préparées chaque jour, alors que les solutions d'actine, de liposomes, d'albumine et de rinçage sont préparées chaque semaine. Les solutions d'albumine, de rinçage et de motilité sont dégazées avant chaque expérience. L'ATP est ajouté aux solutions de motilité avant chaque série d'expériences, et le pH de ces solutions est ajusté à 7.4. Pour les expériences portant sur l'effet de la méthylcellulose, seules les solutions de rinçage et de motilité contenaient de la méthylcellulose (à 1,2% p/v: [KCl] = 50, 70, 80 mM; et à 0,6%: [KCl] = 25, 70, 80, 90 mM). Pour les expériences portant sur l'effet de la carboxyfluorescéine, le fluorophore n'a été ajouté qu'à la solution de motilité.

Voici l'ordre dans lequel chaque solution a été perfusée pour observer le déplacement de filaments d'actine ou de liposomes.

1-On fixe tout d'abord l'HMM à la lamelle de la façon suivante: On perfuse avec 50 μ l d'HMM à l'une des ouvertures sous la lamelle, puis on incline la lame à puits dans l'autre sens de façon à perfuser de nouveau avec 50 μ l d'HMM à l'autre côté. Lorsque l'on veut observer le déplacement de filaments d'actine, l'incubation est de 15 secondes, mais de deux minutes dans le cas des liposomes.

2-On élimine l'HMM non-liée à la surface de la lamelle en perfusant à deux reprises avec 50 μ l d'une solution d'albumine 0,5 mg/ml dans le tampon AB standard (pH 7.4). On laisse incuber pendant une minute. Ce traitement permet aussi d'empêcher que les filaments d'actine adhèrent au collodion.

3-On remplace ensuite la solution d'albumine par une solution de rinçage dans les conditions ioniques à tester en perfusant à deux reprises avec 50 μ l de ce tampon.

4-On met alors les filaments d'actine, ou les liposomes, en présence de la surface de myosine en perfusant à deux reprises avec 50 μ l d'actine fluorescente (diluée à 0,25 μ g/ml dans une solution d'albumine 0,5 mg/ml, AB standard, pH 7.4), ou 50 μ l du mélange d'actine-liposomes dans les mêmes conditions ioniques.

5-On rince les filaments (ou les liposomes) non-liés en perfusant avec 50 μ l du tampon choisi. En absence d'ATP, il se forme un lien actine-myosine, ce qui nous permet d'éliminer seulement les filaments non-liés. Il est impossible de distinguer les filaments individuellement sans un tel rinçage. Pour ce qui est des liposomes, il est essentiel de rincer très délicatement (prendre de 30 à 60 secondes pour perfuser avec 50 μ l). La délicatesse de ce rinçage est cruciale.

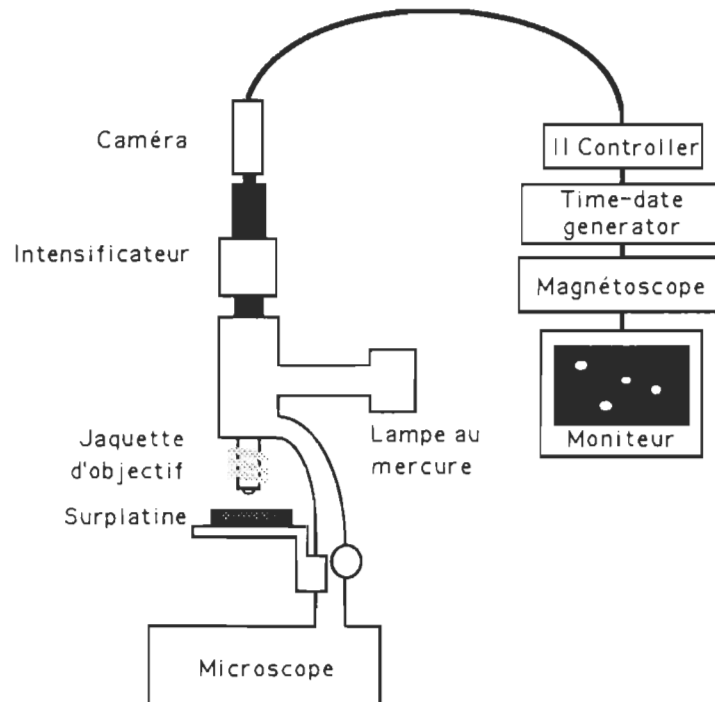
6-On dépose une goutte d'huile sur la lamelle et on procède à la mise au point de l'image sur la face interne de la lamelle. Les filaments, ou les liposomes, seront immobiles car il n'y a pas d'ATP.

7-Pour activer la préparation, on perfuse avec 50 μ l de solution de motilité (solution de rinçage contenant 1 mM d'ATP). Le déplacement des filaments ou des liposomes débute dans les secondes qui suivent la perfusion. Pour les liposomes, cette perfusion est critique. Si la perfusion est trop rapide, le courant créé sera suffisant pour arracher les liposomes, ne laissant que des liposomes trop bien collés pour être déplacés par la myosine. Les filaments d'actine ne sont pas affectés par la rapidité de la perfusion. Il est plus facile de perfuser doucement les solutions de rinçage et de motilité si la lame à puits est encore inclinée à 45°.

2.6- Équipement pour la microscopie

La figure 11 illustre l'équipement de microscopie utilisé pour visualiser et enregistrer le déplacement des filaments d'actine et des liposomes. La lumière émise par une lampe au mercure est filtrée pour n'exciter que les fluorophores employés: la rhodamine, liée à l'actine, ou la carboxyfluorescéine, encapsulée par les liposomes. Un second filtre sélectionne les longueurs d'onde émises par ces fluorophores. Bien qu'il soit possible de voir sans caméra les liposomes (très clairement) et les filaments d'actine (très faiblement), leur fluorescence est grandement réduite après dix secondes (par photobleaching des fluorophores). L'utilisation d'une caméra et d'un intensificateur de luminosité, tous deux alimentés et réglés par un module de contrôle, est donc essentielle pour suivre le déplacement d'objets pour de longues durées. L'observation se fait sur un moniteur et les images sont enregistrées avec un magnétoscope VHS standard. Un appareil inscrit le temps au centième de seconde sur chaque image. La liste qui suit décrit chaque composant utilisé pour la microscopie-vidéo.

Figure 11. Montage de l'équipement pour la microscopie-vidéo.



Microscopie:

- Microscope Leitz Orthoplan (Leitz Wetzlar, Germany)
- Filtres pour la fluorescence: Leitz I2 (fluorescéine; excitation 450-490 nm/arrêt 515 nm); Leitz N2 (rhodamine; 530-560/580).
- Objectif Leitz 100x à iris, (EF 100, 160/0.17, 1.25-0.60 OEL).
- Lampe au mercure 50 W (Osram, Germany)
- Huile à immersion (Low autofluorescence type FF, Cargile, Cedar Grove, NJ).

Vidéo:

- Hamamatsu Intensified Charge Coupled Device Camera C2400-87; ensemble composé de C2400-77 (Miniature CCD video camera module), C2400-68 (Intensifier head) et M4314 (II controller). (Hamamatsu Photonics, Japan).
- Time-date generator Panasonic WJ-810 (Panasonic, Japon).
- Magnétoscope HQ VHS Sony SLV-393 (Sony, Japon).
- Moniteur vidéo Sony PVM-1342Q (Sony, Japon)

2.7- Thermorégulation

Un système de contrôle de la température a été utilisé. Comme l'ont montré plusieurs auteurs (Anson 1992, Homsher et al 1992), la température influence grandement l'interaction actine-myosine. Homsher recommande que la température soit supérieure 20°C. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi de fixer la température à $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Comme la lame à puits est en contact direct avec la platine du microscope et avec l'objectif à immersion, nous avons dû prendre soin d'éviter que ces deux pièces ne réchauffent la lame à puits. Nous avons d'abord construit une jaquette d'objectif en enroulant un tuyau de cuivre (diamètre 3/16") autour de l'objectif. Nous avons ensuite eu recours à une surplatine thermorégulatrice (conçue par Forget & al, 1981). Ce dispositif fait circuler l'eau entre deux plaques de verre scellées, et se fixe sur la platine du microscope. La température de l'eau circulant dans ces dispositifs fut contrôlée par un bain thermostaté (Refrigerated bath RB5 avec un thermostat Techne Tempette TE-8A, Mandel Sci. Co, NJ). La température de la lame à puits a été mesurée grâce à une sonde thermique (Omega Probe F3101, Omega, Stamford, CT) dont le signal est converti en degrés Celsius par le programme intégré d'un multimètre (Digital Keithley 195A, program #6). Des tests ont été effectués pour vérifier la rapidité à laquelle la température de la lame à puits est ramenée à la température voulue. En simulant les perfusions normales, ce système prend moins d'une minute pour ramener à $23 \pm 1^\circ\text{C}$ les solutions perfusées à une température initiale de 10°C . Finalement, en coinçant la sonde thermique entre la surplatine et l'objectif, nous avons vérifié que la température directement sous l'objectif n'est pas différente de la température du bain.

2.8- Impression des images

Les images vidéo ont d'abord été sélectionnées avec un magnétoscope VHS, imprimées sur papier thermosensible (Video Graphic Printer, UP-850, Sony, Japon; High Density Printing Paper II, UPP-110HD, Johns Scientifique, Lachine). Ces images ont ensuite été numérisées à 600 dpi par un digitaliseur Arcus Plus et le logiciel Photolook v.1.1 (Agfa, Germany). Le traitement des images a été effectué grâce au logiciel Photoshop v.2.5 (Adobe, CA) et le montage final fut

assemblé par le logiciel Freehand v.4.0 (Aldus, MD). L'impression a finalement été effectuée sur une imprimante laser à 1200 dpi.

2.9- Méthodologie pour le calcul de l'indice de motilité

Pour les expériences portant sur l'effet des conditions ioniques sur la motilité, un indice semi-quantitatif a été calculé comme suit. Chaque lame à puits est préparée puis immédiatement observée, pendant une période de dix minutes. Pour les liposomes, une cote de 0 à 4 est donnée selon le nombre de liposomes différents qui se sont déplacés activement (sur plus de trois longueurs dans une direction donnée):

- 0: Aucun mouvement n'a été observé durant la période de dix minutes.
- 1: De un à cinq liposomes différents se sont déplacés.
- 2: Environ un liposome s'est déplacé dans chaque champ observé (chaque champ est observé de 30 s. à une minute).
- 3: Environ trois liposomes différents se sont déplacés dans chaque champ observé.
- 4: Plus de cinq déplacements par champ ont été observés.

Pour les filaments d'actine, leur petite taille et leur grand nombre nous ont empêché d'assigner une cote de motilité aussi détaillée que celle des liposomes, plus gros et moins nombreux. Une cote de 0 à 2 a donc été attribuée selon le nombre de filaments qui bougeaient pour une période de dix minutes consécutives:

- 0: Aucun déplacement n'a été observé.
- 1: De un à dix filaments différents se sont déplacés.
- 2: Plus de dix filaments différents se sont déplacés.

Pour chaque condition ionique testée, ces cotes de motilité ont été additionnées. Un indice de motilité a été déterminé en calculant, pour chaque condition, le pourcentage du score maximum que ce total a atteint. Voici le détail du calcul pour les liposomes de DSPC dans les conditions standards:

•Pour quatre des lames à puits observées, plus de cinq liposomes différents se sont déplacés dans chacun des champs observés. La cote maximale 4/4 a donc été assignée quatre fois : $4 \times (4/4)$;

•Pour trois des lames à puits observées, environ trois liposomes différents se sont déplacés dans chacun des champs observés. La cote 3/4 a donc été assignée trois fois : $3 \times (3/4)$;

•Pour quatre des lames à puits observées, presque tous les champs nous ont permis d'observer le déplacement d'un liposome. La cote 2/4 a été assignée quatre fois: $4 \times (2/4)$;

•Pour trois des lames à puits observées, seulement quelques champs ont révélé des liposomes mobiles. Ainsi, pour les dix minutes d'observation (ce qui correspond à 10-20 champs pour 30-60 secondes), seulement un à cinq liposomes différents se sont déplacés. La cote 1/4 a été assignée trois fois: $1 \times (1/4)$;

•Finalement, pour une seule lame à puits nous n'avons observé aucun mouvement pendant les dix minutes d'observation. La cote 0/4 n'a été assignée qu'une fois: $1 \times (0/4)$.

Le score total est 36 [$(4 \times 4/4) + (3 \times 3/4) + (4 \times 2/4) + (3 \times 1/4) + (1 \times 0/4)$] sur un maximum de 60 [$15 \text{ lames} \times 4/4$]. L'indice de motilité attribué est donc 36/60, ou 60%.

2.10- Méthodologie pour le calcul de la vitesse

La vitesse du déplacement des filaments d'actine et des liposomes a été déterminée en calculant les déplacements en X et Y de leurs images sur l'écran. Des séquences représentatives des mouvements ont été choisies sur le lot des expériences effectuées dans les conditions standard. En fixant une acétate sur un moniteur, la position des objets a été marquée en prenant soin de noter le temps (au 1/100 de seconde) encodé sur chaque image par le générateur de temps. La position des objets a été décomposée en coordonnées X et Y manuellement, en superposant l'acétate à une grille de 130 x 180 lignes. À l'aide

d'un chiffrier électronique, les valeurs de chaque triplet de données (temps, coordonnée en X, coordonnée en Y) sont soustraites des valeurs du triplet suivant pour obtenir le temps écoulé, le déplacement en X et le déplacement en Y. Les déplacements en X et Y ont été convertis en micromètres par les facteurs de conversion suivants: un déplacement d'une case sur l'axe Y (axe vertical) représente 0,5195 μm alors qu'en X (axe horizontal) il représente 0,4938 μm . Ces facteurs ont été calculés en étalonnant la grille à l'aide d'une lame micrométrique (filmée verticalement et horizontalement). La vitesse instantanée (entre chaque triplet de données consécutif) a été déterminée en calculant le rapport du déplacement réel par le temps écoulé. Les vitesses moyennes des filaments et des liposomes ont été calculées en faisant la moyenne de toutes les vitesses instantanées.

3- RÉSULTATS

Nos travaux sur l'interaction directe actine-lipide nous ont permis d'observer un phénomène qui n'a encore jamais été décrit: le déplacement de liposomes sur une surface de myosine, en présence d'actine et d'ATP. Ces observations nous permettent de répondre aux questions que soulève cette découverte: Quels sont les facteurs essentiels à ce phénomène? Quelles forces sont à la base de ces mouvements? Ce déplacement est-il le résultat d'une interaction directe ou indirecte entre l'actine et les liposomes? S'agit-il d'une interaction entre l'actine et les liposomes?

Dans le but de caractériser la nature de ce phénomène, nous avons, dans un premier temps, déterminé les facteurs qui sont essentiels au déplacement des liposomes. Dans un deuxième temps, nous avons comparé le déplacement des liposomes à celui des filaments d'actine seuls. Nous avons ensuite étudié l'effet de concentrations de magnésium, puis de potassium. Pour terminer, nous avons vérifié l'effet de la méthylcellulose sur la motilité des liposomes en présence d'actine. Pour ce dernier groupe d'expériences, les données ont été obtenues par l'observation de 172 lames à puits (en trois séries, pour lesquelles toutes les préparations ont été refaites: liposomes, actine, myosine, jusqu'aux solutions mères).

3.0- Facteurs nécessaires au mouvement des liposomes

Les liposomes se déplacent sur une surface enduite de myosine.

Nous avons observé le déplacement de liposomes sur une surface enduite d'HMM. À notre connaissance, nous sommes les premiers à décrire ce phénomène. Pour que ce mouvement se produise, les liposomes, composés de phospholipides, doivent avoir préalablement interagi avec l'actine. Le déplacement des liposomes requiert aussi la présence d'ATP et de magnésium.

Le déplacement des liposomes dépend de l'interaction actine-myosine

L'interaction entre l'actine et la myosine est à la source de ce mouvement puisque les facteurs nécessaires au déplacement des liposomes sont les mêmes que pour le déplacement des filaments d'actine (actine, myosine, magnésium, ATP), tels que décrit par Kron & Spudich (1986). Aucun déplacement actif n'est observé en l'absence d'un seul de ces facteurs. Le déplacement n'est pas possible en présence d'HMM inactivé au NEM, un agent alkylant des fonctions sulfhydryles reconnu pour inactiver l'interaction actine-myosine (Kohno & Morales 1985, Freed et al 1986). Comme cet agent n'affecte pas la polymérisation de l'actine, on peut rejeter la possibilité que les mouvements que nous avons observés soient dus à la polymérisation de l'actine lors de la perfusion d'ATP dans le milieu. Le déplacement des liposomes dépend donc de l'interaction actine-myosine.

Le déplacement des liposomes est possible dans différentes conditions expérimentales

Le déplacement des liposomes a été observé dans un éventail de conditions présentées au tableau 7.

Tableau 7
Conditions dans lesquelles le déplacement de liposomes a été observé.

Paramètre	Conditions
État de la myosine	HMM, myosine en solution ou en bâtonnets
État de l'actine	actine monomérique ou prépolymérisée
Concentration de l'actine lors de l'incubation	0,125 à 3,2 mg/ml
Concentration de liposomes lors de l'incubation	0,072 à 2 mg/ml
Ratio actine-lipides	0,597 à 1,2 (mg/mg)
Durée de l'incubation	5 minutes à 2 mois
Concentration de KCl	0 à 50 mM, 90 mM avec méthylcellulose 0,6%
Concentration de $MgCl_2$	1 à 20 mM

Ce n'est pas l'HMM libre mais bien l'HMM adsorbé à la surface de la lamelle qui est responsable du mouvement puisque, d'une part, les mouvements se produisent lorsque l'HMM libre est éliminé en rinçant abondamment et que, d'autre part, on n'observe pratiquement aucun mouvement lorsque l'on perfuse un mélange d'actine-liposomes, d'ATP et de HMM dans une lame à puits. La lamelle doit donc être d'abord enduite d'HMM pour qu'un mouvement soit observé. Par ailleurs les liposomes ne se déplacent pas seulement à la surface de la lamelle, mais aussi à d'autres niveaux dans le volume présent entre la lame et la lamelle.

Le déplacement des liposomes dépend d'une interaction directe entre l'actine et les lipides.

Le mouvement des liposomes se produisent même lorsque les liposomes ont été incubés avec l'actine purifiée par chromatographie. Ceci indique que les protéines contaminantes n'interviennent pas dans ce phénomène. Ce phénomène résulte donc d'une interaction directe entre l'actine et les phospholipides.

Le déplacement des liposomes dépend d'une interaction spécifique entre l'actine et les lipides.

Le mouvement des liposomes dépend bien d'une interaction spécifique entre l'actine et les liposomes. En effet, en utilisant des liposomes composés de deux phospholipides, le DSPC (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) et le DOPC (1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine), nous avons constaté que les indices de motilité des liposomes de DSPC sont toujours plus grands que ceux des liposomes de DOPC (voir le tableau 8). Par exemple, en présence de 1 mM de magnésium, pratiquement aucun liposome de DOPC ne bouge alors que les liposomes de DSPC bougent beaucoup (sur 18 préparations, seuls deux liposomes de DOPC ont bougé comparativement à plus de 500 pour les liposomes de DSPC dans les mêmes conditions). La nature des phospholipides est donc importante dans le déplacement des liposomes. Nous avons par ailleurs remarqué que la localisation de l'actine diffère selon que l'actine fluorescente est mise en présence de liposomes de DSPC ou de DOPC. L'actine est concentrée à la surface des liposomes dans le cas du DSPC, alors qu'elle est uniformément répartie dans le cas des liposomes de DOPC. Ceci indique une plus grande interaction entre l'actine et les liposomes de DSPC que ceux de DOPC.

Tableau 8
Indices de motilité des liposomes de DSPC et de DOPC.

	Indice de motilité des liposomes (%)	
	DSPC	DOPC
Effet du magnésium		
1 mM	61,7	2,8
4 mM	60	21,2
10 mM	50	50
Effet du KCl		
0 mM	65	29,2
25 mM	60	21,2
50 mM	6.3	0

Le mouvement est toujours plus important avec les liposomes de DSPC que ceux de DOPC. Ces résultats sont compatibles avec des travaux en microscopie électronique qui ont révélé que les liposomes de DSPC interagissaient beaucoup plus avec l'actine que ceux de DOPC (Pigeon, 1992; Cermakian al, 1992). Ceci indique que le mouvement des liposomes dépend de la nature des phospholipides, donc d'une interaction spécifique entre l'actine et certains lipides.

3.1- Description des mouvements des liposomes

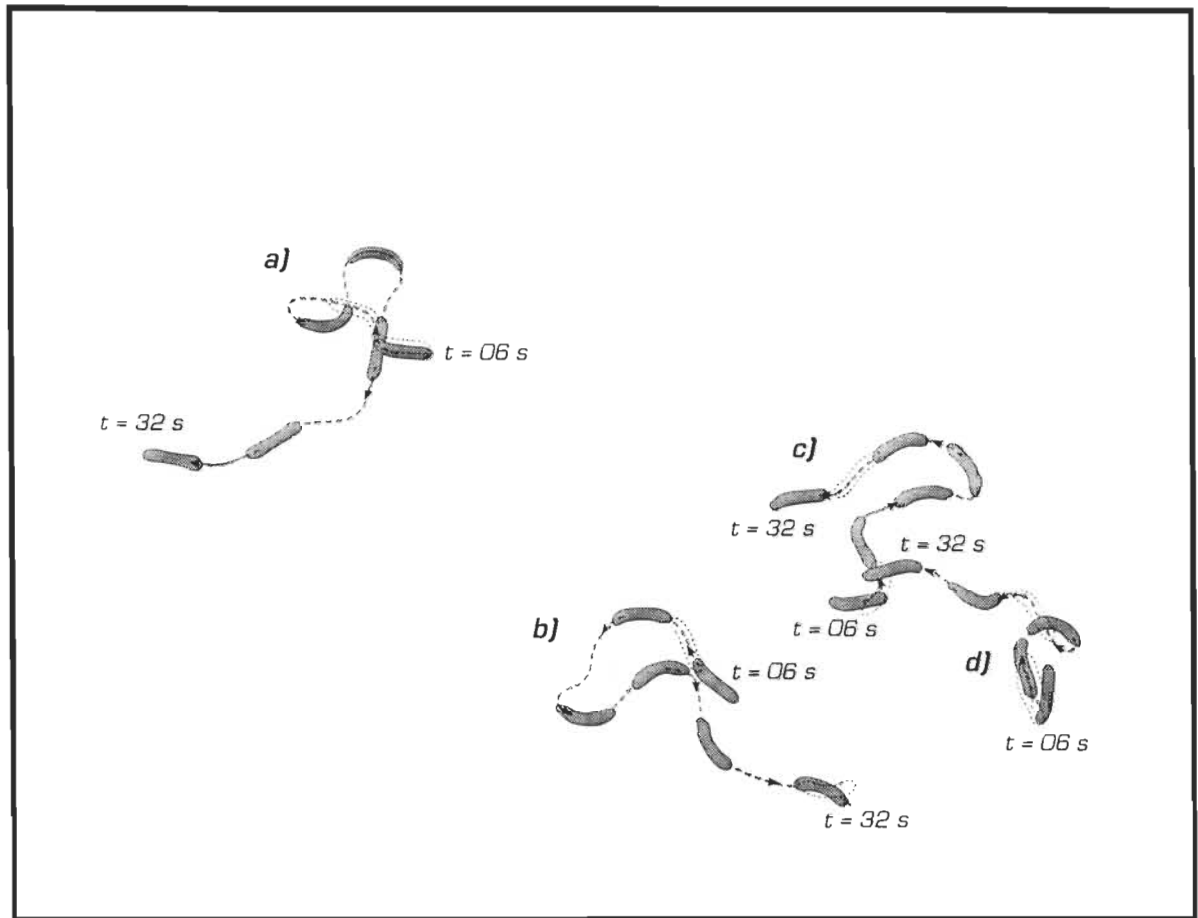
Les données présentées dans cette section proviennent d'expériences effectuées, sauf indication contraire, dans les conditions standards (1 mg/ml d'actine et 1 mg/ml de liposomes dans le tampon AB) telles que décrites dans la section Matériel et méthodes. Outre l'inhibition du mouvement par le potassium, nous n'avons pas remarqué de différence dans les trajectoires et les vitesses de déplacement des liposomes lorsque nous avons étudié l'effet des conditions ioniques et de la méthylcellulose.

3.1.1- Le déplacement des filaments d'actine

Pour mieux décrire et comprendre ce qu'il y a de particulier avec le déplacement des liposomes, nous devons d'abord décrire les caractéristiques des mouvements des filaments d'actine. Ceci a déjà été publié (pour une revue voir Higashi-Fujime, 1991) et nous n'en survolerons ici que les éléments essentiels à partir de nos propres observations. Les figures 12 et 13 nous permettent de suivre le parcours de quatre filaments d'actine dans une préparation standard. La figure 12 schématise la position de quatre filaments, ce qui permet de suivre plus facilement leur trajet. Le montage de la figure 13 nous permet de voir chaque filament d'actine tel qu'il apparaît à l'écran durant une minute. Bien que les filaments ne soient pas nettement visibles sur papier, cette séquence peut être visionnée (une vidéocassette est disponible à la médiathèque de l'Université du Québec à Trois-Rivières).

Les figures 12 et 13 nous permettent de constater que le déplacement des filaments est un mouvement actif, par opposition aux mouvements passifs, tel que le flot de la solution et le mouvement brownien. Certains filaments sont complètement immobiles, alors que d'autres se déplacent à des vitesses variables. Les filaments peuvent progresser sur plusieurs microns dans une même direction, puis s'arrêter quelques secondes. Un filament peut changer de direction fréquemment, indépendamment de la trajectoire des autres filaments. Les mouvements passifs ont par contre des caractéristiques nettement différentes. Dans le cas des mouvements dus au flot d'une solution, tous les filaments se déplacent dans une même direction et à la même vitesse. Dans le cas du mouvement brownien, les filaments se déplacent très peu et de façon aléatoire, dans aucune direction privilégiée, et sans aucun déplacement net.

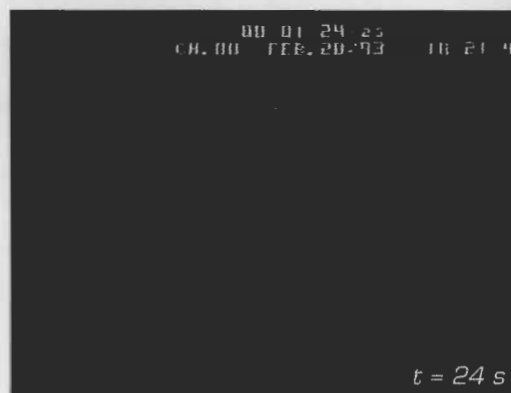
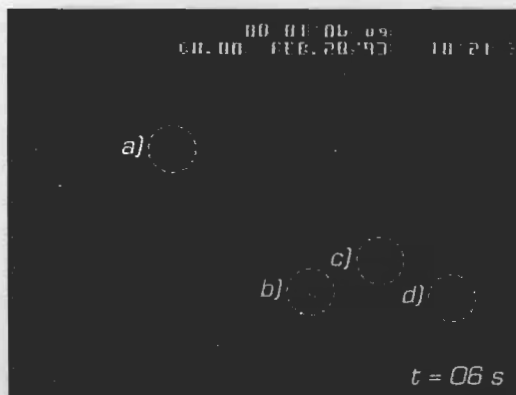
Figure 12. Position des filaments d'actine se déplaçant sur une surface de myosine.



Légende: Schéma du déplacement des filaments d'actine sur une surface enduite d'HMM en présence de magnésium et d'ATP. Le cadre représente un champ couvrant environ 70 x 100 micromètres. Le temps est indiqué en secondes et les lettres permettent de retracer la position de chaque filament sur les images reproduites à la figure 13.

Figure 13. (Page suivante) Déplacement de filaments d'actine dans les moteurs à l'actomyosine.

Légende: Déplacement des filaments d'actine sur une surface enduite d'HMM en présence de magnésium et d'ATP. Chaque image couvre un champ d'environ 70 x 100 micromètres. Le déplacement des filaments encerclés dans la première case ($t=06s$) peut être suivi à l'aide du schéma de la figure 12. Le temps est indiqué en secondes.



De plus, le mouvement des filaments d'actine ne se produit que dans des conditions bien définies, ce qui n'est pas le cas des mouvements passifs. Le mouvement des filaments d'actine requiert en effet la présence simultanée d'ATP, de magnésium, et de myosine. En absence de l'un ou l'autre de ces composants, on observe soit l'immobilité de tous les filaments due aux liens rigor entre l'actine et la myosine, soit le mouvement brownien et le flot de tous les filaments pêle-mêle dans une même direction (en absence de myosine les filaments ne sont pas arrimés, ils suivent alors le flot de la solution).

Les figures 12 et 13 nous permettent aussi de constater que le mouvement des filaments est unidirectionnel. Un filament ne fait jamais marche arrière (c'est toujours la même extrémité du filament qui précède l'autre) quoiqu'il puisse occasionnellement faire volte-face comme c'est le cas du filament "a" (de 10 à 14 s.) et du filament "d" (de 20 à 24 s.). Le déplacement de chaque filament est indépendant de celui des autres et ne suit aucune direction prévisible. Il arrive fréquemment qu'un filament croise le parcours qu'il a déjà emprunté (ou emprunté par un autre filament), mais il ne reprend jamais exactement le même tracé.

3.1.2- Le déplacement des liposomes

Les figures 14 et 15 illustrent le déplacement des liposomes. La première séquence (14a) montre le trajet de deux liposomes pendant 28 s. tandis que la seconde (14b) n'en montre qu'un seul, qui se déplace à une vitesse particulièrement élevée (il parcourt 20 microns en 9 s.). La figure 15 schématise le parcours de neuf liposomes.

Figure 14. (Page suivante) Déplacement de liposomes dans les moteurs à l'actomyosine.

Légende (A et B): Déplacement de liposomes sur une surface enduite d'HMM en présence de magnésium et d'ATP. Chaque image couvre environ 20 x 45 micromètres. Le déplacement de chaque liposome peut être suivi à l'aide du schéma. Le temps est indiqué en secondes.

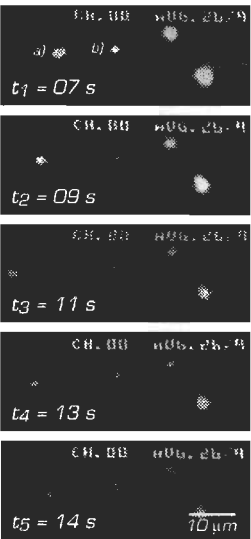
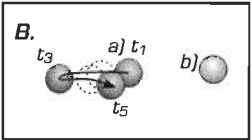
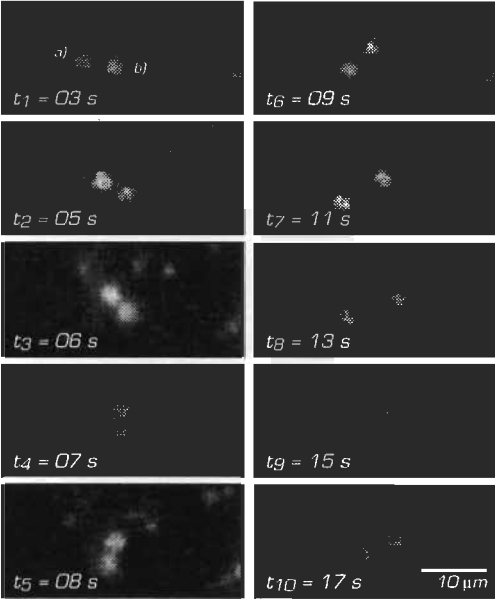
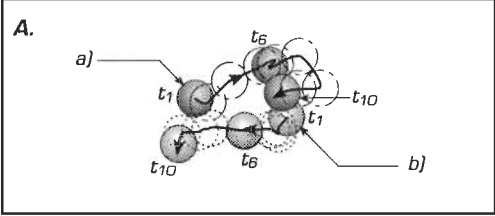
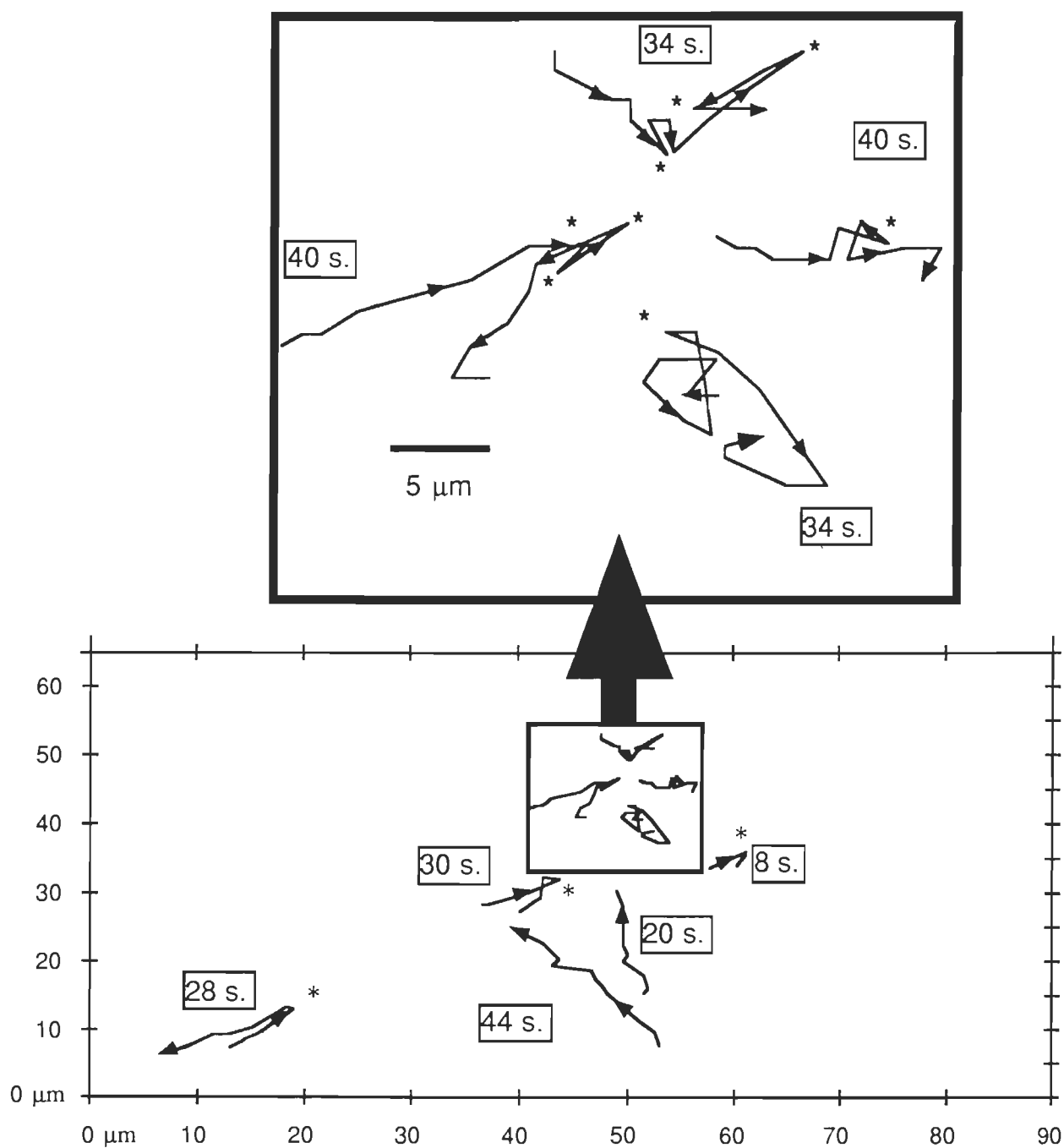


Figure 15. Position de liposomes se déplaçant sur une surface de myosine.



Légende de la figure 15: Schéma du déplacement des liposomes sur une surface enduite d'HMM en présence de magnésium et d'ATP. Le cadre représente un champ couvrant environ 65 x 90 micromètres, et la section agrandie couvre environ 15 x 25 micromètres. Le temps, en secondes, écoulé entre la position initiale et la position finale est encadré. Les astérisques soulignent les mouvements d'allers et retours des liposomes.

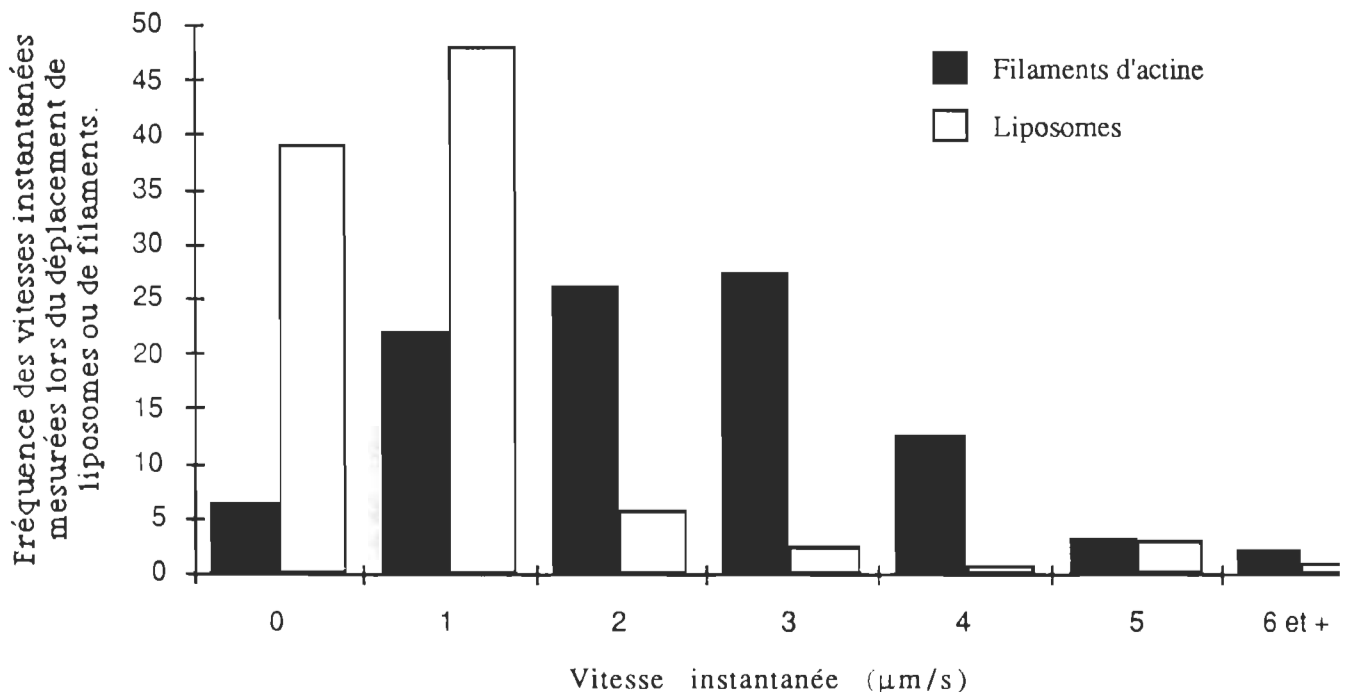
Les figures 14 et 15 nous permettent de constater que le déplacement des liposomes n'est pas un mouvement passif. Les mouvements des liposomes sont intermittents et se font dans différentes directions et à des vitesses variables. Certains sont toujours immobiles alors que d'autres ne le sont que momentanément. Pour que le mouvement des liposomes se produise, il faut qu'il y ait dans le milieu de l'ATP, du magnésium, de la myosine et de l'actine. En absence d'ATP, les liposomes sont complètement immobiles, alors qu'en absence d'actine ou de myosine, on peut observer le déplacement passif des liposomes qui sont entraînés par le flot de la solution.

Bien que dans certains cas les déplacements se font le long d'une seule direction, comme celui illustré à la figure 14b, les déplacements s'effectuent habituellement en zigzag. Les figures 14a et 15 en sont de bons exemples. Les liposomes qui s'y promènent le font indépendamment les uns des autres. Il existe une différence importante entre le déplacement des filaments d'actine et celui des liposomes: contrairement aux filaments d'actine qui se déplacent de façon unidirectionnelle, les liposomes peuvent effectuer des allers et retours. Les liposomes a) de la figure 14a et 14b en sont des exemples. Ce mouvement "bidirectionnel" est si fréquent que dans chaque champ observé (de 30 à 1 min.), il y a toujours au moins un liposome qui fait un aller-retour. La figure 15 illustre bien cette tendance puisqu'on y retrouve 11 va-et-vient (tous indiqués par des astérisques). Sur les neuf liposomes qui ont été suivis pendant 44 s., seulement deux ne font aucun aller-retour. Le liposome '34 s.' fait même trois allers-retours.

3.1.3- La vitesse des liposomes

L'histogramme de la figure 16 illustre la distribution des fréquences (en pourcentage) des vitesses instantanées de filaments d'actine et de liposomes. Cette figure nous permet dans un premier temps de constater que la vitesse des liposomes est inférieure à celle des filaments. Dans un deuxième temps, la distribution de fréquence des vitesses instantanées des liposomes est fortement asymétrique, comparativement à celle des filaments. Malgré cette asymétrie la distribution de la vitesse des liposomes couvre la même étendue que celle des filaments.

Figure 16. Distribution de fréquence (en pourcentage) des vitesses instantanées des liposomes et des filaments d'actine.



Le tableau 9 nous permet aussi de comparer les vitesses des liposomes avec celles des filaments d'actine. La vitesse moyenne des liposomes est de 0,74 $\mu\text{m/s}$. La vitesse instantanée maximale que nous avons observé est de 5,53 $\mu\text{m/s}$. Rappelons que la vitesse instantanée est le rapport entre le déplacement et le temps écoulé pour chaque portion du parcours où les liposomes se déplacent, alors que la vitesse moyenne est le rapport du déplacement total effectué par un liposome divisé par un temps donné.

Tableau 9
Estimation de la vitesse des filaments d'actine et des liposomes.

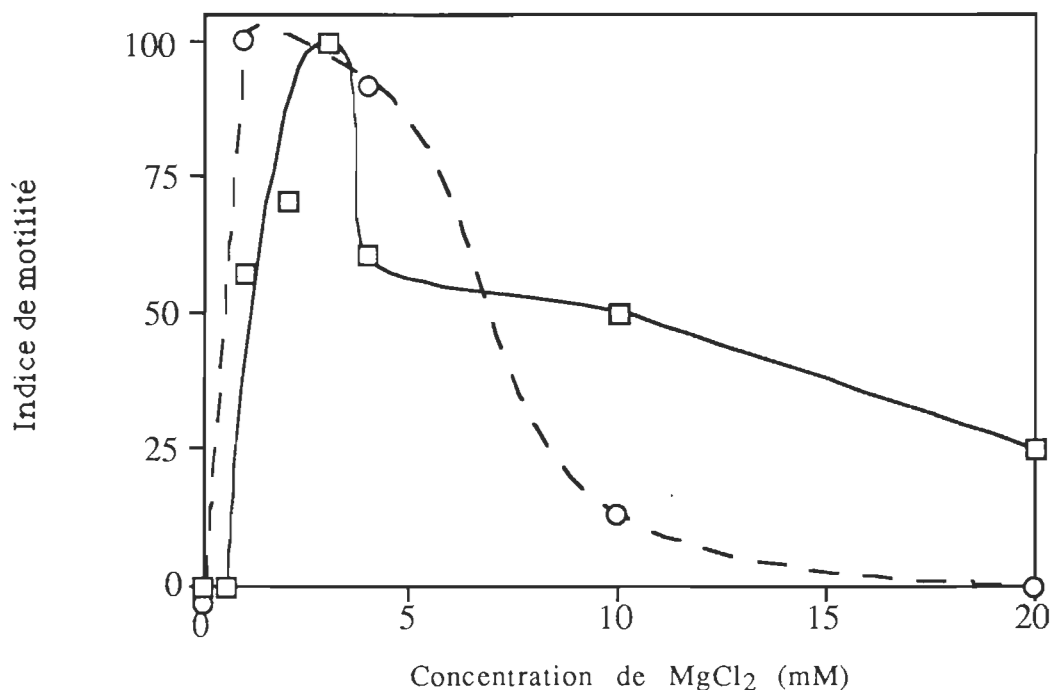
Estimation	Filaments	Liposomes
Vitesse moyenne	1,81 $\mu\text{m/s}$ (n=95)	0,74 $\mu\text{m/s}$ (n=194)
Vitesse moyenne maximale	1,87 $\mu\text{m/s}$	3,91 $\mu\text{m/s}$
Vitesse instantanée moyenne (\pm écart-type)	2,38 \pm 1,33 $\mu\text{m/s}$ (n=95)	0,95 \pm 1,12 $\mu\text{m/s}$ (n=194)
Vitesse instantanée maximale	6,53 $\mu\text{m/s}$	5,53 $\mu\text{m/s}$

En résumé, contrairement au mouvement des filaments d'actine, les liposomes ne se déplacent pas seulement de façon unidirectionnelle, mais ils effectuent fréquemment des allers et retours. Bien que la distribution de fréquence des vitesses des liposomes soit aussi étendue que celle des filaments d'actine, la vitesse moyenne des liposomes (0,74 $\mu\text{m/s}$) est inférieure à celle des filaments d'actine dans les mêmes conditions (1,81 $\mu\text{m/s}$).

3.2- Effet du magnésium

Les travaux de l'équipe du Dr Gicquaud ont clairement montré l'importance des cations divalents dans l'interaction actine-phospholipides. Nous avons étudié l'effet de la concentration du magnésium pour voir si le déplacement des liposomes se fait à des concentrations compatibles avec celles qui existent *in vivo*. Nous avons fait varier la concentration de magnésium, tout en gardant les autres conditions constantes, en particulier la concentration de KCl, fixée à 25 mM. La figure 17 représente l'effet de la concentration du magnésium sur la motilité des liposomes et des filaments d'actine.

Figure 17. Effet du magnésium sur l'indice de motilité des liposomes et des filaments d'actine



Légende: Indices de motilité obtenus lors de l'observation de filaments d'actine (○) ou de liposomes de DSPC ayant préalablement interagi avec de l'actine purifiée (□) sur une surface enduite d'HMM, en présence d'ATP, de potassium 25 mM et de concentrations croissantes de magnésium.

La figure 17 montre qu'en absence de magnésium on n'observe aucun mouvement de liposomes ou de filaments d'actine. En présence de 1 mM de magnésium, les filaments d'actine et les liposomes composés de DSPC se mettent à bouger. La concentration de magnésium où nous avons observé le plus de mouvement est de 1 mM pour les filaments d'actine et de 3 mM pour les liposomes composés de DSPC. En présence de 20 mM de magnésium, le mouvement des filaments d'actine est complètement inhibé alors que celui des liposomes est encore possible.

Le magnésium semble avoir un double rôle: celui d'activer le déplacement des filaments d'actine et celui de favoriser celui des liposomes. Ces résultats sont compatibles avec les travaux de Kron & Spudich (1986) qui montrent que le glissement de l'actine sur une surface de myosine requiert la présence de magnésium.

En conclusion, nous pouvons affirmer que le magnésium est nécessaire au mouvement des liposomes à des concentrations qui sont compatibles avec celles qui existent *in vivo*.

3.3- Effet du potassium

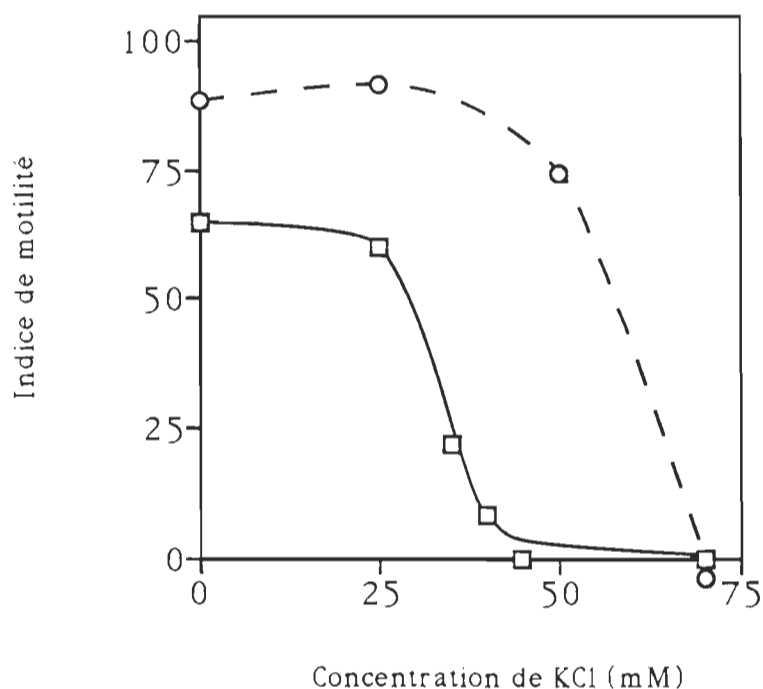
Les expériences effectuées sur l'effet du potassium ont pour but de vérifier si les mouvements de liposomes se font en présence de concentrations physiologiques de KCl. Pour ce faire nous avons étudié la motilité des liposomes et des filaments d'actine en ne faisant varier que la concentration de KCl. La figure 18 illustre l'effet des concentrations croissantes de potassium sur la motilité des liposomes et des filaments d'actine.

Les courbes de la figure 18 nous permettent de constater que les concentrations croissantes de potassium ont un effet inhibiteur sur la motilité. Le KCl à concentration supérieure à 25 mM inhibe les déplacements des filaments d'actine et des liposomes. Dans le cas des liposomes, l'inhibition est complète à 45 mM alors qu'il faut 75 mM de KCl pour inhiber le déplacement des filaments d'actine. L'inhibition du déplacement des filaments d'actine par le

potassium a déjà été rapportée par plusieurs auteurs (Kron & Spudich, 1986; Higashi-Fujime, 1991). La concentration de potassium où nous avons observé le plus de mouvement est de 25 mM pour les filaments d'actine et de 0 pour les liposomes.

Le potassium n'est donc pas essentiel aux mouvements puisque les liposomes et les filaments peuvent se déplacer en son absence, mais il a un effet inhibiteur autant sur la motilité des liposomes et des filaments d'actine.

Figure 18. Effet du potassium sur l'indice de motilité des liposomes et des filaments d'actine.



Légende: Indices de motilité obtenus lors de l'observation de filaments d'actine (○) ou de liposomes de DSPC ayant préalablement interagi avec de l'actine purifiée (□) sur une surface enduite d'HMM, en présence d'ATP, de magnésium 4 mM et de concentrations croissantes de potassium.

3.4- Effet de la méthylcellulose

Comme nous venons de le voir, dans les moteurs à l'actomyosine, le potassium 70 mM inhibe le déplacement des filaments d'actine. Ceci paraît à première vue paradoxal puisque l'on sait qu'*in vivo*, la concentration de potassium est de l'ordre de 100 mM, ce qui n'empêche pas l'interaction actine-myosine. Il y a donc nécessairement un facteur présent dans les cellules qui est absent des moteurs à l'actomyosine de Kron. Comme le rapporte Higashi-Fujime (1991), certains auteurs ont réussi à lever cette inhibition en augmentant la viscosité du milieu. Selon cet auteur, c'est le mouvement brownien qui empêche l'interaction actine-myosine déjà affaiblie par de fortes concentrations de potassium. En augmentant la viscosité avec un polymère inerte, le méthylcellulose, il est possible de réduire le mouvement brownien et de rétablir la motilité des filaments d'actine, même en présence de 150 mM de KCl (Homsher & al, 1992).

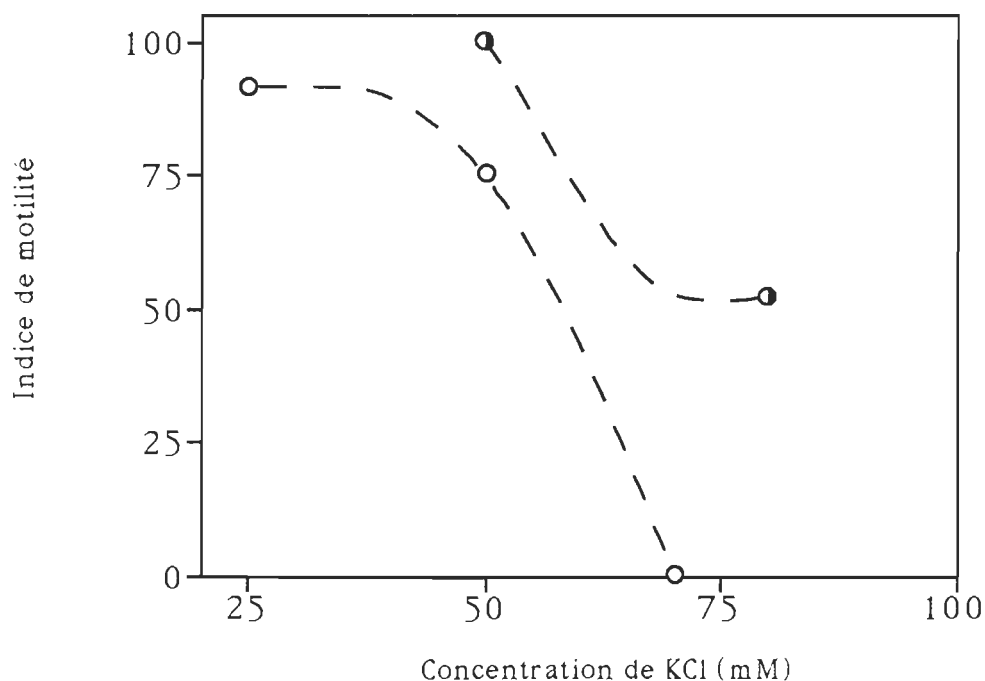
Nous avons vérifié si le méthylcellulose pouvait aussi rétablir la motilité des liposomes aux concentrations où le potassium a un effet inhibiteur. La figure 19 représente les indices de motilité obtenus pour le déplacement des filaments d'actine en présence de méthylcellulose.

La présence de méthylcellulose à 1,2% augmente la motilité des filaments d'actine. À une concentration de potassium de 50 mM par exemple, l'indice de motilité passe de 75% à 100%. Le méthylcellulose lève aussi l'inhibition du potassium 70 mM, et permet même le déplacement des filaments d'actine en présence de 80 mM de KCl.

La figure 20 nous montre les indices de motilité des liposomes en présence et en absence de méthylcellulose.

La présence de méthylcellulose permet le déplacement des liposomes en présence de concentrations de potassium plus élevées. Alors que le potassium inhibe complètement la motilité à 70 mM, la présence de méthylcellulose permet le déplacement de liposomes jusqu'à 90 mM de KCl. Ainsi, l'utilisation de méthylcellulose à 0,6% permet le déplacement des liposomes à des concentrations physiologiques de potassium. Par contre, en présence 1,2% de méthylcellulose la

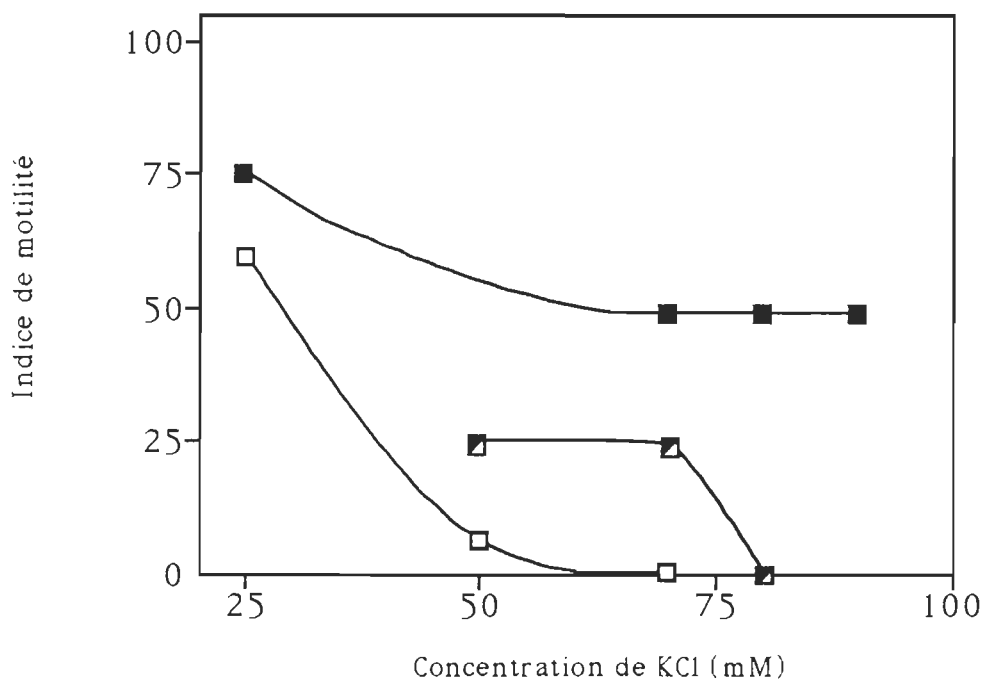
Figure 19. Effet de la méthylcellulose sur l'indice de motilité des filaments d'actine.



Légende: Indices de motilité obtenus lors de l'observation de filaments d'actine sur une surface enduite d'HMM, en présence d'ATP, de magnésium 4 mM, de concentrations croissantes de potassium en absence (○) ou en présence (●) de méthylcellulose 1.2%.

motilité est inhibée à 80 mM, alors qu'elle ne l'est pas avec 0,6%. Ces résultats nous portent à croire que l'inhibition du déplacement des liposomes par le potassium est causée par un facteur semblable au facteur qui inhibe le déplacement des filaments d'actine dans les moteurs à l'actomyosine. Il s'agirait du mouvement brownien si l'on se fie aux interprétations d'Higashi-Fujime (1991).

Figure 20. Effet de la méthylcellulose sur l'indice de motilité des liposomes.



Légende: Indices de motilité obtenus lors de l'observation de liposomes de DSPC ayant préalablement interagi avec de l'actine purifiée sur une surface enduite d'HMM, en présence d'ATP, de magnésium 4 mM, de concentrations croissantes de potassium, en absence (□) ou en présence de méthylcellulose 0.6% (■) ou 1.2% (▣).

3.5- Résumé

Nous avons établi pour la première fois que les filaments d'actine qui se déplacent peuvent entraîner des liposomes composés de lipides purs. Ce phénomène implique qu'il existe une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires. Les conditions dans lesquelles une telle interaction se produit sont compatibles avec celles qui existent *in vivo*.

4- DISCUSSION

Bien que l'objectif de ce travail soit de démontrer que l'interaction directe actine-phospholipides peut jouer un rôle *in vivo*, il nous apparaît essentiel de discuter du phénomène que nous venons d'observer. Ainsi, nous développerons dans la première partie de la discussion un modèle d'interaction entre l'actine, la myosine et les liposomes qui explique l'ensemble de nos observations. Dans la deuxième partie de la discussion, nous allons voir en quoi nos résultats peuvent nous aider à déterminer la nature de l'interaction entre l'actine et les lipides et aussi à élaborer un modèle moléculaire de cette interaction. Nous ferons, dans une troisième étape, état des critiques faites à l'égard de ce mode de liaison entre l'actine et les membranes. Nous en viendrons finalement à la quatrième partie de la discussion, où nous débatterons du rôle d'une interaction directe actine-lipides dans la cellule.

4.1- Modélisation de l'interaction actine-myosine-liposome

4.1.1- Le déplacement des liposomes est un mouvement actif qui dépend de l'interaction actine-myosine.

Nos résultats permettent de conclure que le déplacement des liposomes est un mouvement qui résulte de l'interaction entre l'actine et la myosine. En éliminant un seul des composants de la préparation (l'ATP, le magnésium, la myosine ou l'actine), le mouvement des liposomes est interrompu. Lorsque l'on inactive la myosine avec un agent alkylant (le N-éthylmaléimide), le mouvement des liposomes, comme celui des filaments, n'est plus possible. Ce résultat écarte la possibilité que le mouvement des liposomes ait pu être causé par la simple polymérisation de l'actine lors de la perfusion d'ATP.

Nous pouvons aussi conclure que les déplacements des liposomes que nous avons observés ne sont pas des mouvements passifs. Les déplacements des liposomes se font sur plusieurs micromètres, et sont fréquemment entrecoupés d'arrêts entre lesquels chaque liposome peut changer de direction. Les liposomes peuvent même revenir sur leurs pas. Ces comportements sont

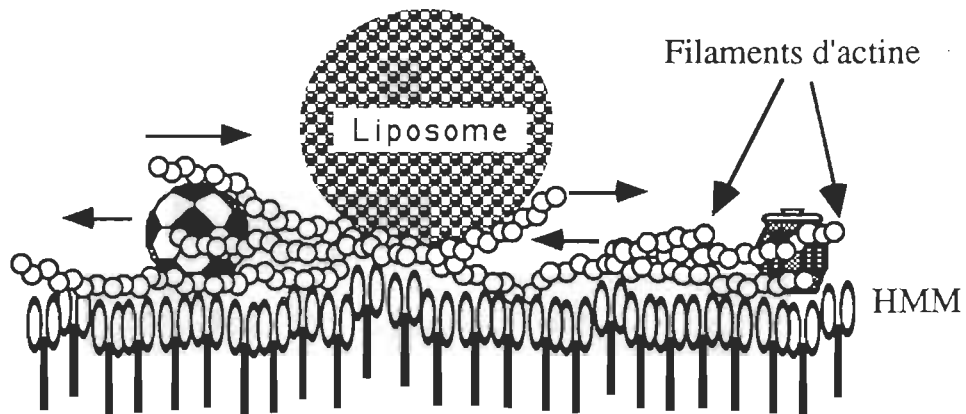
nettement différents des mouvements passifs. Nous pouvons tout d'abord rejeter le flot de la solution comme cause du mouvement. En absence de myosine ou d'actine, le flot de la solution pousse tous les liposomes dans la même direction et à la même vitesse. Les tracés présentés aux figures 14 et 15 montrent clairement que les liposomes se déplacent indépendamment les uns des autres, souvent dans des directions opposées et à des vitesses différentes et variables. Nous pouvons ensuite éliminer le mouvement brownien puisque les déplacements qu'il provoque sont toujours petits et aléatoires, de sorte que même lorsque le mouvement brownien agite les liposomes dans nos préparations, il n'engendre jamais de déplacements aussi importants et directionnels que ceux que nous avons décrits. Finalement, le simple fait qu'il soit possible d'interrompre la motilité en perfusant une solution sans ATP, et que l'on puisse ensuite réactiver les mouvements en perfusant à nouveau de l'ATP, nous assure que le déplacement des liposomes dans les moteurs à l'actomyosine est bien un mouvement actif dépendant de l'interaction entre l'actine et la myosine.

4.1.2- Le déplacement des liposomes dépend d'une interaction spécifique et directe entre l'actine et les liposomes.

Bien que nous ayons clairement démontré que la source du mouvement provenait de l'interaction actine-myosine, on ne peut encore assumer que le mouvement des liposomes dépende d'une interaction spécifique entre l'actine et les liposomes. Les liposomes auraient pu être déplacés d'une façon non-spécifique par les mouvements d'un enchevêtrement de filaments d'actine (comme l'illustre la figure 21).

De la même façon, on ne peut encore affirmer que le déplacement des liposomes dépend d'une interaction directe entre l'actine et les phospholipides. On pourrait objecter que l'actine est liée aux liposomes par l'entremise de protéines contaminantes, mais ça ne semble pas le cas. Les électrophorèses que nous avons effectuées nous ont montré l'absence de protéines contaminantes majeures dans les préparations d'actine purifiées par chromatographie, comme ce fut le cas pour les électrophorèses effectuées par Pigeon (1992). Si le déplacement des liposomes avait été médié par des protéines liant l'actine à la

Figure 21. Exemple de mouvements non-spécifiques.



membrane, nous aurions probablement détecté une différence entre les indices de motilité des liposomes mélangés avec l'actine purifiée par chromatographie et ceux mélangés avec de l'actine non-purifiée. Or, ce ne fut pas le cas. Il est donc peu probable que des protéines contaminantes jouent un rôle dans la liaison de l'actine aux liposomes. Le mouvement des liposomes semble donc dépendre d'une interaction directe entre l'actine et les lipides.

Bien que l'interaction actine-lipides semble directe, on ne peut encore rejeter la possibilité que le mouvement que nous avons observé résulte d'une interaction passive (non-spécifique) entre l'actine et les liposomes. Pour nous assurer que le déplacement des liposomes dépend bien d'une interaction spécifique entre l'actine et les phospholipides, nous avons employé des liposomes composés de deux phospholipides différents: le DSPC et le DOPC. Les travaux précédents ont montré que les liposomes de DSPC interagissaient beaucoup plus avec l'actine que ceux de DOPC dans des conditions ioniques semblables aux nôtres (Cermakian & al, 1992; Pigeon, 1992). Si le mouvement que nous avons décrit n'avait pas été spécifique au phospholipide, nous aurions dû nous attendre à ce que les liposomes soient traînés par le réseau d'actine indépendamment de la nature des phospholipides qui composent les liposomes. Or, les deux types de liposomes ne se comportent pas de la même façon. Premièrement, dans toutes les conditions testées, que ce soit pour l'effet du magnésium, du potassium ou de la méthylcellulose, les indices de motilité des

liposomes de DSPC sont toujours plus grands que ceux du DOPC. Ceci implique que dans les mêmes conditions les liposomes de DOPC sont moins souvent entraînés par les filaments d'actine que les liposomes de DSPC. Par conséquent, la nature du phospholipide composant les liposomes joue un rôle dans leur déplacement. Deuxièmement, les expériences portant sur l'effet du magnésium ont montré qu'il fallait une plus grande concentration de magnésium pour activer le déplacement des liposomes de DOPC (3 mM) que ceux de DSPC (1 mM). Troisièmement, dans certaines conditions (à 1 mM de $MgCl_2$) seuls les liposomes de DSPC bougent. Finalement, si l'interaction entre l'actine et les liposomes n'avait pas été spécifique, on aurait pu s'attendre à ce que le déplacement des liposomes soit grandement affecté par la quantité d'actine présente dans nos préparations. Ce ne fut pas le cas: nous avons observé le déplacement des liposomes avec des concentrations d'actine de 3,2 à 0,125 mg/ml. Par ailleurs, les motifs de fluorescence de l'actine révélèrent une plus grande interaction avec les liposomes de DSPC que les liposomes de DOPC. La fluorescence de l'actine était concentrée à la surface des liposomes dans le cas du DSPC, alors qu'elle était uniformément répartie dans le cas des liposomes de DOPC.

Ces résultats nous mènent donc à la conclusion que le déplacement des liposomes dépend à la fois de l'interaction actine-HMM et d'une interaction spécifique et directe entre l'actine et les phospholipides.

4.1.3- Mécanismes à la base des divers mouvements des liposomes

Nous avons réussi à faire bouger des liposomes sur une surface de myosine, et cela grâce à l'interaction directe de l'actine avec les phospholipides. Dans les lignes qui suivent, nous expliquerons comment l'interaction actine-myosine-liposome peut mécaniquement engendrer les mouvements.

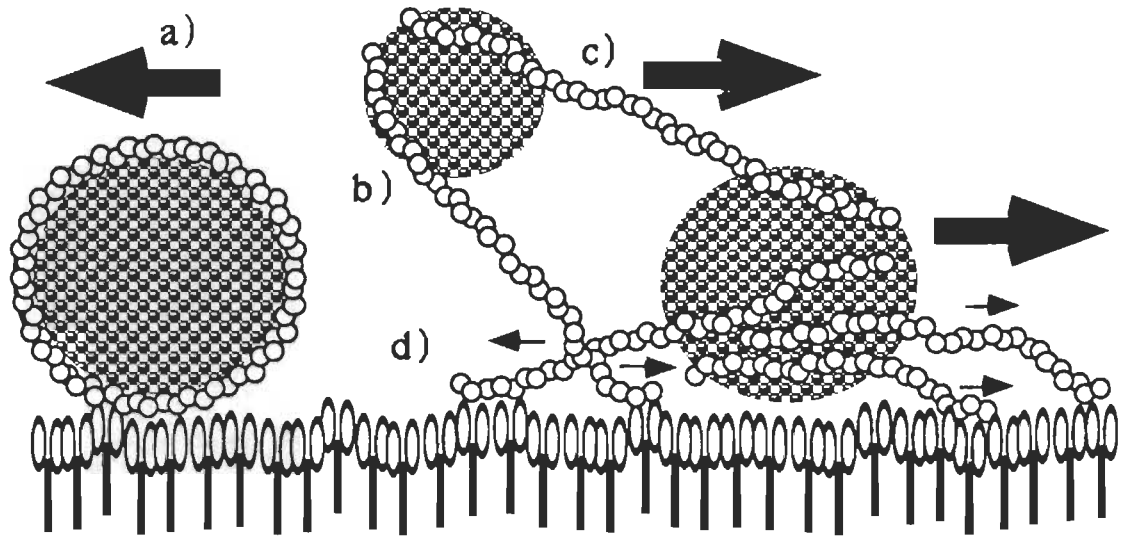
Commençons dans un premier temps par localiser à quel endroit s'effectue l'interaction actine-myosine. Certains de nos résultats indiquent que la présence de HMM non-collée à la surface et d'ATP n'est pas suffisante pour que les liposomes bougent. Ceci implique que la myosine qui pourrait se libérer de la

surface après le rinçage ne peut pas être responsable des mouvements. Comme la surface de la lamelle doit d'abord être enduite de myosine, l'interaction entre l'actine et la myosine se produit nécessairement à la surface de la lamelle, exactement comme c'est le cas dans la version originale des moteurs à l'actomyosine de Kron. Quatre mécanismes possibles peuvent expliquer les divers mouvements que nous avons observés. La figure 22 schématise ces mécanismes dont nous ferons la critique.

La façon la plus probable d'expliquer le mouvement des liposomes est celle qui est illustrée à la figure 22d. Ce sont les portions des filaments qui dépassent du liposome qui interagissent avec la surface de HMM pour tirer le liposome. Pour qu'un déplacement puisse se produire, il faut que les forces qui tirent dans une direction soient plus grandes que les forces tirant dans les directions opposées. Les forces opposées qui s'exercent peuvent d'ailleurs expliquer pourquoi les liposomes se déplacent habituellement à des vitesses moins élevées que les filaments. Ce modèle est compatible avec les résultats précédemment obtenus en microscopie électronique, qui montrent que les filaments dépassent bel et bien des liposomes.

À titre d'exemple, la figure 23, qui provient directement du mémoire présenté par Benoit Pigeon (1992), nous donne une excellente idée de la disposition paracristalline que prennent les filaments d'actine à la surface des liposomes (en particulier aux images 23b et c). On voit clairement à la figure 23b que les filaments d'actine dépassent des liposomes. D'autre part, lors d'expériences avec l'actine fluorescente, nous avons nettement vu que la fluorescence de l'actine se concentrait sur le pourtour des liposomes, et nous avons aussi observé des filaments d'actine dépasser de la surface de liposomes. Nous devons toutefois préciser que sur certains clichés, aucun filament ne semble dépasser des liposomes. Il est donc nécessaire d'envisager la possibilité que la myosine puisse interagir avec l'actine qui est directement collée sur le liposome, tel qu'illustré à la figure 22a.

Figure 22. Organisations possibles de l'actine interagissant avec la surface des liposomes.



Légende: a) aucun filament d'actine ne dépasse du liposome, seule l'actine liée à la surface du liposome peut interagir avec l'HMM; b) un liposome éloigné de la surface est tiré par un long filament qui interagit avec l'HMM; c) un liposome éloigné de la surface est indirectement tiré par un autre liposome en y étant arrimé par un filament d'actine; d) les filaments d'actine qui dépassent du liposome interagissent avec la surface enduite d'HMM.

Bien que nous ayons démontré que l'interaction actine-myosine se produit à la surface de la lamelle, nous devons garder à l'esprit que nous avons aussi observé des liposomes bouger entre la lame et la lamelle. Nous devons donc développer un mécanisme qui tienne compte du fait qu'un liposome puisse être déplacé tout en n'étant pas en contact direct avec la surface. Comme il n'y a aucune protéine pour ponter entre eux les filaments d'actine, les liposomes qui sont tirés à distance par la myosine peuvent l'être par de longs filaments qui interagissent directement avec la surface (fig. 22b). Ils peuvent aussi être accrochés par des filaments à un autre liposome (fig. 22c), lui-même tiré par des filaments qui interagissent avec la myosine. Bien que la seconde explication semble à première vue peu probable, deux faits nous portent à croire qu'elle est

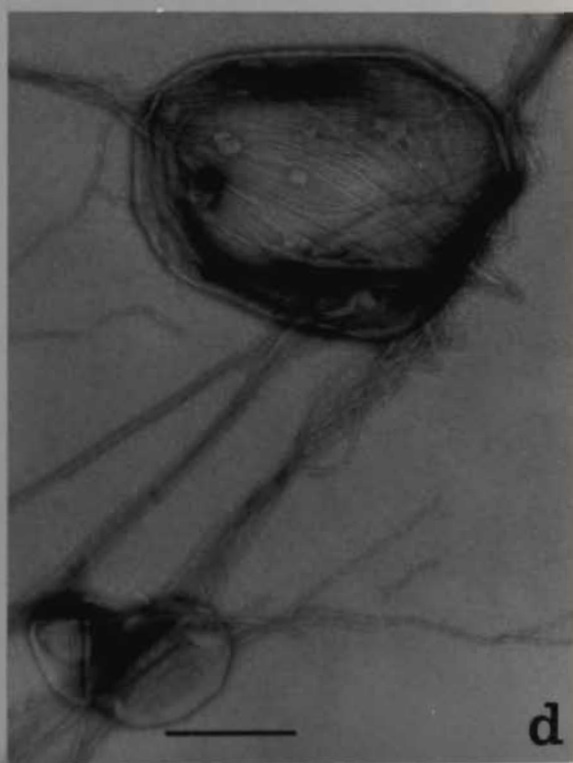
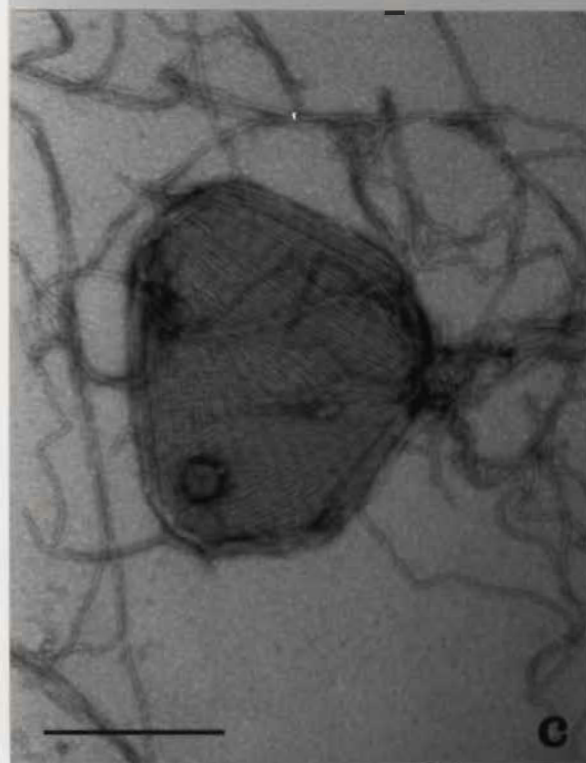
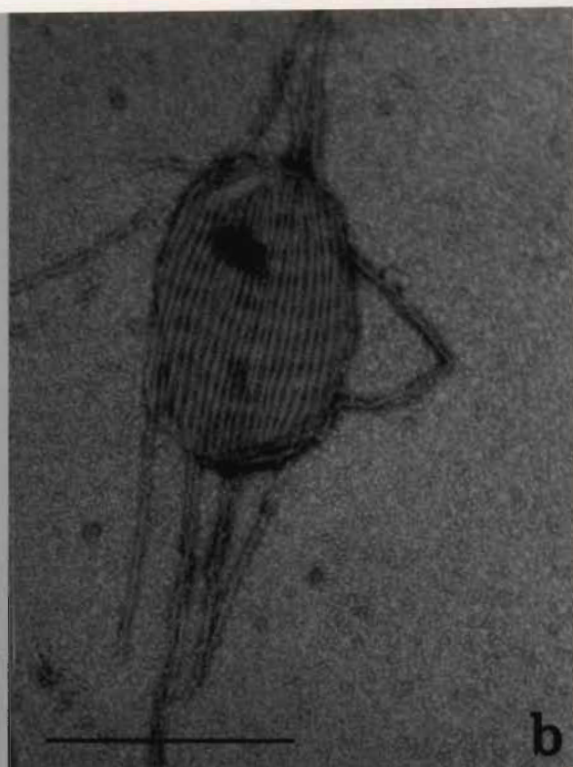
plausible. Le premier provient des photographies obtenues en microscopie électronique de la figure 23a et d. Sur cette figure on remarque que certains filaments peuvent interagir simultanément avec plusieurs liposomes. Le second fait supportant une interaction liposome-actine-liposome provient des expériences faites avec l'actine fluorescente. Nous avons alors observé qu'à l'occasion des faisceaux d'actine entourent des liposomes, parfois éloignés d'une vingtaine de micromètres. Il est donc clair qu'un filament peut lier plus d'un liposome à la fois, ce qui est compatible avec le modèle illustré à la figure 22c. Les modèles 22b et 22c nous permettent d'expliquer le mouvement des liposomes qui ne sont pas en contact direct avec la surface de la lamelle. Bien que les deux soient possibles, nos résultats ne nous permettent toutefois pas éliminer ni l'un ni l'autre de ces modèles.

Mais comment pouvons-nous expliquer les fréquents mouvements bidirectionnels des liposomes? Il faut d'abord savoir que les filaments d'actine ont une polarité, ce qui a pour effet de rendre leurs déplacements unidirectionnels. On ignore encore quelle est la polarité des filaments qui interagissent avec les liposomes (toutes les tentatives se sont avérées infructueuses: Rioux & Gicquaud, 1985; Cermakian, communication personnelle).

L'hypothèse d'un virage à 180° serait plus plausible si un seul filament était responsable du déplacement, mais il est peu probable que seul un bout de filament dépasse de toute la surface de l'ensemble des liposomes que nous avons observés. Le second modèle, beaucoup plus plausible, requiert qu'il y ait, de part et d'autre du liposome, plusieurs filaments parallèles, mais de polarités différentes, qui tirent à tous moments dans deux directions opposées. Pour qu'un liposome fasse un mouvement de va-et-vient, les forces doivent successivement provenir de filaments de polarités opposées (fig.22, liposome de droite). Comme nous avons pu le voir en microscopie électronique (fig. 23), la plupart des filaments adoptent une organisation compatible avec cette explication. Si les filaments se disposaient plutôt de façon aléatoire, le va-et-vient des liposomes ne serait pas aussi fréquent.

Figure 23. (Page suivante) Coloration négative d'actine interagissant avec des liposomes (tirée du mémoire de Benoit Pigeon, 1992).

Légende: Conditions expérimentales: actine-G purifiée 0,1 mg/ml, liposomes de DSPC 0,4 mg/ml, en présence de diverses concentrations de CaCl_2 : A) 1 mM; B) 2 mM; C) 5 mM et D) 10 mM. La barre représente 300 nm.



Ceci nous permet d'affirmer que ce sont principalement les filaments d'actine qui dépassent de la surface des liposomes qui tirent sur les liposomes en interagissant avec la surface de myosine. Ce modèle peut expliquer les mouvements bidirectionnels des liposomes, dont la fréquence n'est pas étrangère au fait que les filaments se disposent de façon paracristalline à la surface des liposomes.

4.1.4- La vitesse des liposomes

Avant de discuter de la vitesse des liposomes, nous devons mentionner que les vitesses que nous avons mesurées pour le déplacement des filaments d'actine sont moins élevées que celle rapportées dans la littérature. Selon Higashi-Fujime (1991), les filaments se déplacent habituellement de 3 à 6 $\mu\text{m/s}$ *in vitro*, ce qui se compare assez bien à la vitesse de glissement des filaments dans le muscle. Il rapporte aussi de grandes variations de la vitesse selon l'état de polymérisation de la myosine (4-6 $\mu\text{m/s}$ pour les bâtonnets, 3,5 $\mu\text{m/s}$ pour la myosine dimérique, 1,2-1,6 $\mu\text{m/s}$ pour les HMM) et, étonnamment, selon le type de surface employée (avec les HMM, la vitesse est de 1,2-1,6 $\mu\text{m/s}$ sur une surface de silicone alors qu'elle est de 7,5 $\mu\text{m/s}$ sur le collodion [30°C]). De la même façon, Homsher & al (1992) ont démontré que de nombreux facteurs peuvent influencer la vitesse des filaments sur l'HMM: concentration d'ATP, d'ADP, du phosphate inorganique, la force ionique, le pH, la température... En comparant les vitesses qu'ils ont mesurées dans des conditions qui se rapprochent des nôtres (surface de collodion, HMM, force ionique de 30 à 40 mM et température de 20 à 25°C), la vitesse des filaments d'actine est d'environ 3 $\mu\text{m/s}$, ce qui est assez proche de notre 2,35 $\mu\text{m/s}$.

Pour ce qui est de la vitesse des liposomes que nous avons mesurée (0,74 $\mu\text{m/s}$) nous ne pouvons la comparer avec d'autres valeurs puisque nous sommes les premiers à décrire ce phénomène. Nous pouvons néanmoins conclure que la vitesse moyenne des liposomes est bien inférieure à celle des filaments d'actine, bien que la distribution de fréquence des vitesses des liposomes couvre la même étendue que celle des filaments d'actine.

4.2- Nature de l'interaction directe actine-phospholipides

Nous avons démontré que le déplacement des liposomes résulte d'une interaction spécifique entre l'actine et les phospholipides, mais nos résultats nous permettent-ils de faire la lumière sur la nature de cette interaction? Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la liaison des protéines à une bicouche lipidique dépend de trois types d'interaction: les interactions électrostatiques, les interactions hydrophobes et les liaisons covalentes. Nous pouvons en partant éliminer la liaison covalente. L'interaction est soit électrostatique, soit hydrophobe, soit mixte.

4.2.1- C'est une interaction principalement électrostatique.

Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que le déplacement des liposomes n'est possible que dans des conditions ioniques particulières. Dans un premier temps, nos résultats montrent que le magnésium favorise le déplacement des liposomes et, comme l'ont rapporté Kron & Spudich (1986), celui des filaments d'actine. Aux concentrations plus élevées, le magnésium réduit à la fois le déplacement des filaments et celui des liposomes. On ne peut donc savoir si l'inhibition du mouvement des liposomes est due à l'inhibition de l'interaction actine-lipides ou à l'inhibition du mouvements des filaments. L'inhibition du mouvement des filaments par des concentrations élevées de magnésium n'a pas été rapportée dans la littérature, probablement parce qu'il ne s'agit pas de concentrations physiologiques. On peut toutefois supposer que les concentrations élevées de magnésium ont le même effet que celles de potassium, c'est-à-dire de réduire l'affinité de la myosine pour l'actine. La motilité des liposomes serait encore possible puisque, comme la MC, les liposomes, en liant l'actine, retiennent les filaments à la surface, ce qui augmente les probabilités d'interactions efficaces.

Dans un deuxième temps, nous avons observé que le potassium 50 mM a un effet inhibiteur important sur la motilité des liposomes. Dans ce cas, on peut conclure que le potassium inhibe complètement l'interaction actine-lipide

puisque à 50 mM de KCl, le mouvement des filaments n'est pas encore inhibé. Nos résultats nous permettent d'affirmer que l'interaction entre l'actine et les liposomes est du moins partiellement de nature électrostatique. Bien qu'il ne nous soit pas possible de rejeter la possibilité qu'une interaction hydrophobe accompagne l'interaction électrostatique, nos résultats sont incompatibles avec une interaction de nature exclusivement hydrophobe. Ceci confirme la nature principalement électrostatique de l'interaction actine-lipides précédemment observée par l'équipe du Dr Gicquaud (Rioux & Gicquaud, 1985; Laliberté & Gicquaud, 1988; St-Onge & Gicquaud, 1989 et 1990; Pigeon 1992; Cermakian & al, 1992; Grimard & al, 1993; Gicquaud, 1993) et par d'autres équipes (Taylor & Taylor, 1992; Ward & al, 1990; Ostlund & al, 1977).

4.2.2- Ce n'est pas interaction de nature hydrophobe.

Quant à la possibilité qu'une interaction hydrophobe accompagne l'interaction électrostatique, un seul argument critiquable appuie cette hypothèse alors que cinq autres la réfutent.

Premièrement, l'interaction avec l'actine affecte la perméabilité des liposomes. Ce phénomène est influencé par la nature des lipides et par la présence de calcium, bien qu'il ait aussi été observé en absence de calcium, ce qui a fait dire aux auteurs que l'interaction actine-lipides était en partie de nature hydrophobe, mais facilitée par des liens électrostatiques (St-Onge & Gicquaud, 1990).

Bien que leurs conclusions rejettent l'interaction directe actine-lipides, les résultats d'Utsumi supportent non seulement une interaction directe actine-lipides, mais appuient aussi les conclusions de St-Onge & Gicquaud, obtenus par la même technique. L'équipe d'Utsumi a elle aussi observé une hausse de la perméabilité membranaire des liposomes induite par l'actine. Leurs résultats montrent clairement qu'en ajoutant du cholestérol aux liposomes, on réduit l'interaction, mais que l'ajout de cétylamine renverse cette diminution, ce que le dicétylphosphate ne peut faire. Les auteurs conclurent que l'interaction actine-lipides est exclusivement hydrophobe en s'appuyant sur le fait que les ions

n'affectent pas l'interaction, des résultats dont ni les chiffres ni les conditions n'ont été publiés. Outre l'absence d'effet des ions, leurs résultats appuient ceux de St-Onge & Gicquaud pour ce qui est de la hausse de perméabilité membranaire induite par l'actine. Les résultats d'Utsumi ne sont d'ailleurs nullement en contradiction avec les modèles avancés par Pigeon (1992) et discutés dans le présent ouvrage, qui expliquent l'importance des liaisons électrostatiques. Le cholestérol, un lipide neutre, réduit l'interaction actine-lipides en diluant les sites de liaisons de l'actine aux liposomes, tandis que la cétylamine, un lipide chargé positivement, compense l'effet du cholestérol en rajoutant des charges positives à la membranes, ce que le dicétylphosphate ne peut faire puisqu'il est chargé négativement.

Deuxièmement, les travaux de Grimard & al (1993) ont aussi montré par des mesures de pression de surface de monocouches que l'actine peut s'insérer entre les lipides seulement si la pression de surface est peu élevée. Il ne peut donc pas y avoir d'insertion de l'actine dans les bicouches des membranes puisque la pression de surface y est trop importante. Ward & al (1990) ont aussi remarqué que l'interaction directe de l'actine avec une monocouche n'en faisait pas varier la pression de surface. Ces auteurs, qui ont remarqué qu'un simple rinçage au magnésium réduisait grandement la formation des paracristaux, ont conclu, comme l'équipe de Gicquaud, que le lien actine-lipides est une interaction de nature électrostatique entre les charges positives des lipides et les charges négatives de l'actine.

Troisièmement, si l'actine s'insère dans la bicouche, cette protéine hautement hydrophile aurait probablement à réorganiser certains de ses domaines pour leur permettre d'interagir avec la phase hydrophobe de la bicouche. Or une étude des spectres de fluorescence intrinsèque de l'actine n'a montré aucun changement conformationnel majeur entre l'actine libre et l'actine liée aux liposomes (St-Onge, 1989).

Quatrièmement, si l'actine s'insérait dans la bicouche, elle aurait probablement été colorée par les sondes lipidiques telles que l'INA ou un analogue de la phosphatidylcholine, le 1-palmitoyl-2-[10-[4-[(trifluorométhyl) diazirinyl] phenyl]-³H] 9-oxaundecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine. Ces

sondes se lient spécifiquement aux domaines protéiques qui sont enfouis dans la zone lipophile des membranes (Niggli & Burger, 1987). L'actine ne se lie pas à ces sondes (Sigrist-Nelson & al, 1977; Bercovici & Gitler, 1978; Meyer & Burger, 1979).

Cinquièmement, si l'actine interagissait avec la partie hydrophobe des lipides, elle aurait sûrement un effet drastique sur la transition de phase des lipides, ce qui n'est pas le cas selon les études effectuées en calorimétrie différentielle à balayage (Pigeon, 1992; Gicquaud, 1993).

Le seul point en faveur d'une interaction hydrophobe est donc cette hausse de perméabilité membranaire observée autant par l'équipe de Gicquaud que celle d'Utsumi. On doit garder à l'esprit qu'il est possible que l'actine puisse provoquer une fuite de fluorophore sans nécessairement s'insérer entre les lipides, mais simplement en créant des tensions localisées à la surface des liposomes.

En conclusion, les seuls résultats soutenant la thèse d'une interaction de nature hydrophobe sont critiquables et les résultats que nous avons obtenus par la technique des moteurs à l'actomyosine sont compatibles avec les conclusions des travaux précédents: l'interaction directe entre l'actine et les lipides est principalement de nature électrostatique.

4.2.3- Modèle moléculaire de l'interaction actine-lipides

a) Les charges négatives de l'actine

Le pH_i de l'actine est de 5,0 (Vandekerckhove & Weber, 1978), par conséquent l'actine porte des charges négatives *in vivo* (Bartels & Elliott, 1985). Ces charges se révèlent essentielles dans son interaction avec plusieurs protéines, en particulier avec la myosine (Cook & al, 1993; Rayment & al, 1993). La liaison actine-myosine est avant tout ionique puis stabilisée par des interactions hydrophobes. Ceci explique la sensibilité au potassium du déplacement des filaments d'actine dans nos moteurs à l'actomyosine (Trayer, 1993).

b) Les charges des membranes

Les membranes cellulaires portent à leur surface une charge nette négative. Cette charge est due aux groupements polaires ou ionisés des constituants mêmes de la membrane (Cevc, 1990). À prime abord, on pourrait croire que la liaison électrostatique de l'actine, chargée négativement, à la membrane, elle-même chargée négativement, est peu probable dans la cellule. Mais les travaux de Seelig nous ont permis d'avancer un modèle moléculaire de l'interaction directe actine-lipides:

Cette équipe a montré que la charge globale d'une membrane affecte la conformation de ses molécules de phosphatidylcholine (PC), qui comptent pour 18 à 55% des lipides membranaires (Carroll, 1989). Dans les membranes artificielles neutres, la tête polaire des PC est parallèle à la surface de la bicouche (Scherer & Seelig, 1987), comme le montre la figure 25a. En présence de charges positives, un changement de conformation survient, de sorte que la tête polaire devient presque perpendiculaire (fig. 25b). Le groupement phosphate est ainsi caché par la choline, et cette dernière émerge de la bicouche (Seelig & al, 1987; Scherer & Seelig, 1989). Dans cette conformation, la charge positive des cholines serait disponible pour lier les charges négatives de l'actine.

Malgré le fait que les membranes naturelles contiennent de 10 à 20% des lipides chargés négativement, ces auteurs ont pu déterminer que dans les membranes des cellules, l'orientation de la tête polaire des PC est parallèle à la bicouche, ce qui est caractéristique d'un environnement électriquement neutre (Scherer & Seelig, 1987). C'est le pontage par les cations divalents des phosphates de phospholipides voisins qui réduit la charge négative des membranes (MacDonald & Seelig, 1987). En effet, le Ca^{++} , qui est 100 fois plus concentré au niveau de la membrane que dans le milieu (Seelig, 1990), se situe seulement à quelques angstroms du groupement phosphate des PC (Herbette & al, 1984; Petersheim & al, 1989). En plus d'annuler la charge négative de deux phosphates (et d'enfouir ces derniers dans la bicouche), la liaison des cations divalents a un effet qui nous intéresse tout particulièrement: elle repousse le groupement choline vers la phase aqueuse de sorte que sa charge positive est

Figure 24. Orientation moléculaire des têtes polaires de la phosphatidylcholine en absence (A) ou en présence de charges positives (B) [tiré de Scherer & Seelig, 1989]

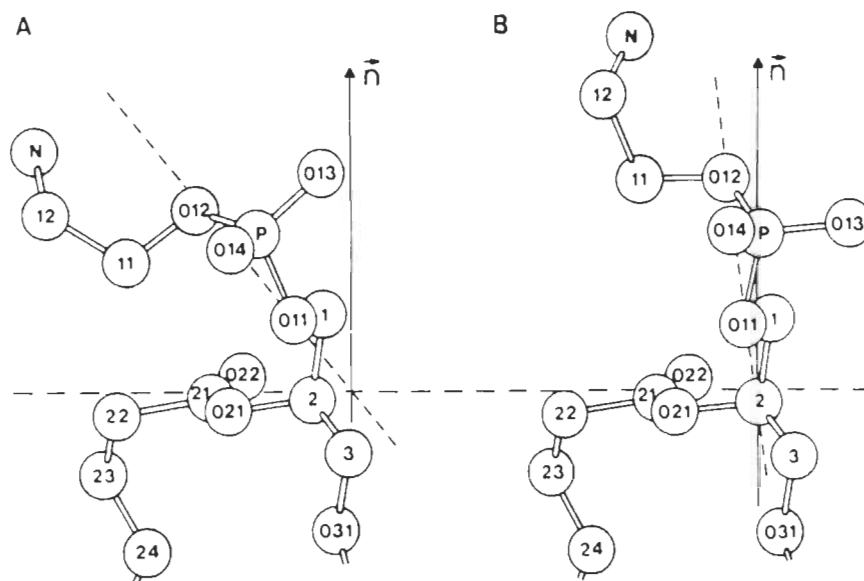


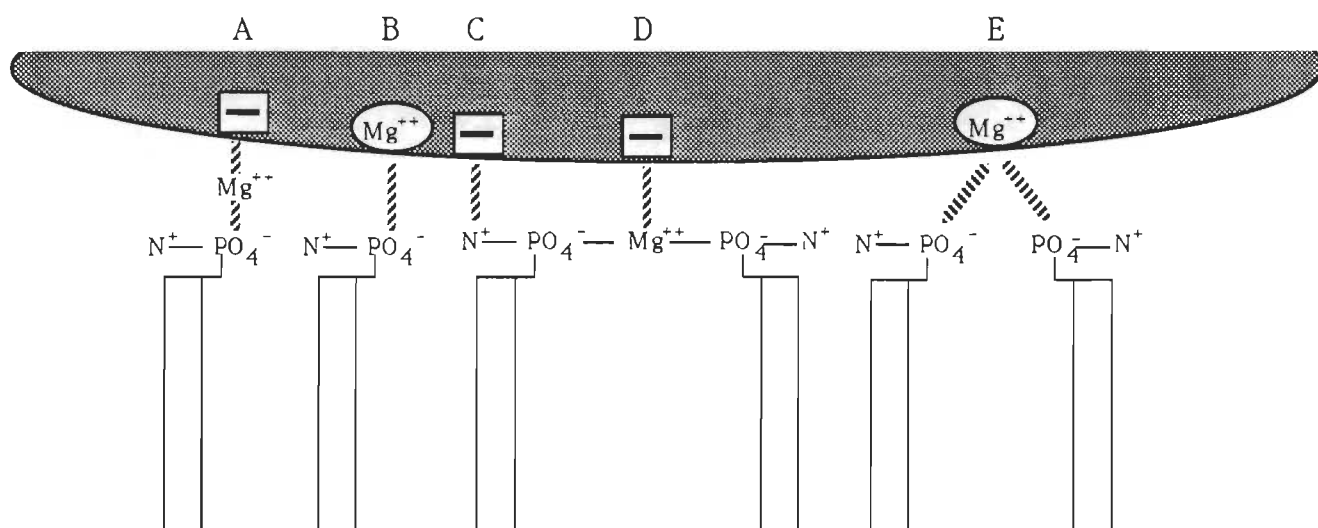
FIGURE 7: Approximate orientation of the phosphocholine headgroup in the absence (A) and in the presence (B) of positive electric charge. (A) corresponds to the crystal structure of phosphatidylethanolamine (Hitchcock et al., 1974). (B) Only the orientation of the phosphate segment can be determined from ^{31}P NMR. The choline part was not changed compared to (A).

encore plus accessible (Seelig, 1990). De l'aveu même des auteurs, la position particulière de cette choline rend favorable l'interaction des protéines, chargées négativement, avec les PC, qui sont des molécules neutres (Seelig & al, 1987), ce qui nous amène à considérer un modèle expliquant la liaison actine-lipides au niveau moléculaire.

c) Modèle moléculaire de l'interaction actine-phospholipides

L'ensemble des résultats de l'équipe du Dr Gicquaud montre que c'est principalement de façon électrostatique que l'actine se lie aux phospholipides. Pour ce faire, les liposomes de PC doivent porter des charges positives, que ce soit en contenant des lipides chargés positivement ou en liant des cations divalents. Le simple fait qu'une interaction soit possible en absence de cations divalents nous permet de rejeter les modèles moléculaires où ce sont les cations divalents qui lient l'actine aux PC, comme le schématise la figure 25. Nous aurions pu concevoir que les cations divalents lient simultanément les phosphates des PC et certains sites de l'actine (les sites pour cations divalents, ou les charges négatives de l'actine).

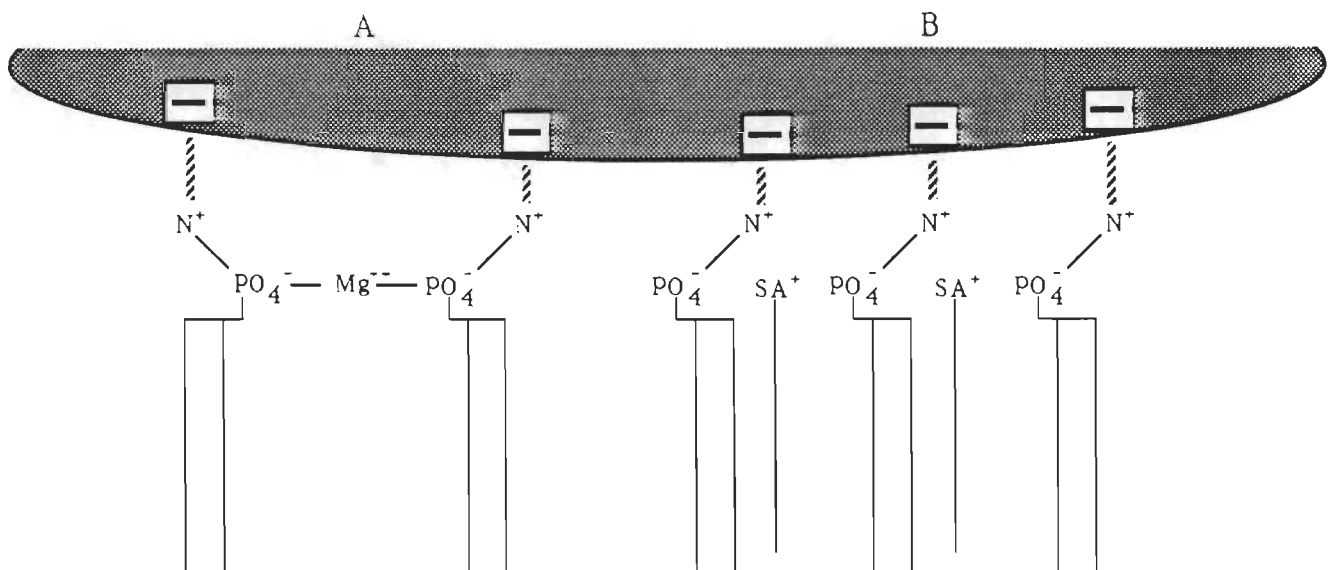
Figure 25. Liaison de l'actine aux phospholipides par l'entremise des cations divalents.



Légende: Les cations divalents lient l'actine aux phospholipides en pontant un [ou deux] phosphate(s) des phospholipides à une des charges négatives de l'actine (A et D) ou bien à un des sites pour cations divalents de l'actine (B et E). Alternativement, la liaison d'un cation divalent aux phosphates de deux phospholipides permet à une charge négative de l'actine de lier directement une charge positive d'un phospholipide (C).

Mais seul le modèle moléculaire faisant intervenir la choline des PC permet d'expliquer que l'actine puisse lier les PC en présence de cations divalents ou en leur absence (si la membrane contient d'autres charges positives, comme la stéarylamine). En plus d'expliquer l'ensemble des résultats obtenus à ce jour, ce modèle, schématisé à la figure 26, respecte le fait que dans les bicouches les cations divalents lient les phosphates de deux phospholipides. Les modèles 25A et 25B ne tenaient pas compte de ce fait.

Figure 26. Liaison de l'actine à la choline des phosphatidylcholines.



Légende: La présence de cations divalents (A) ou de lipides chargés (B) dans le plan de la bicouche rend l'environnement de PC électriquement neutre ou positif, ce qui repousse la choline vers la phase aqueuse où elle peut se lier à une des charges négatives de l'actine.

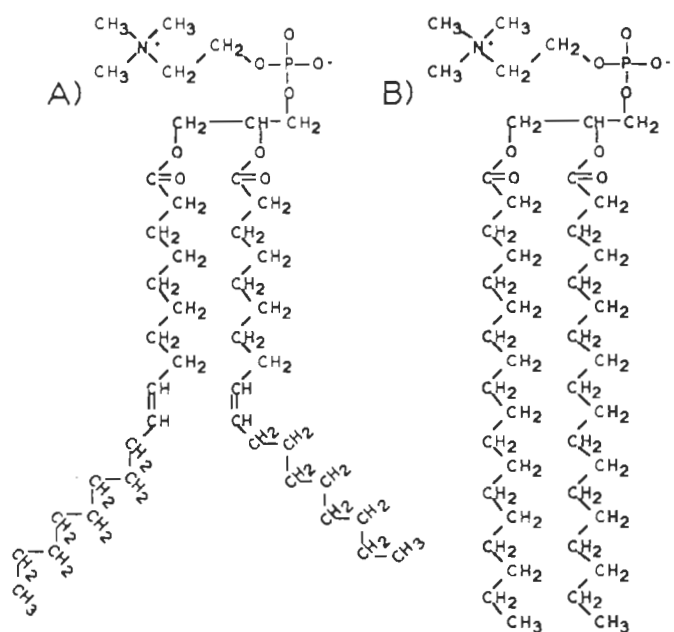
Sachant d'une part que les PC représentent une bonne proportion des lipides membranaires, et que, d'autre part, la conformation du dipôle des PC dans les membranes naturelles est caractéristique d'un environnement

électriquement neutre, on peut supposer que dans les membranes cellulaires, il y a un bon nombre de PC dont la choline est repoussée vers la phase aqueuse. Ces charges positives sont disponibles pour interagir avec les sites de l'actine. Ce modèle permet d'ailleurs d'expliquer la diminution de l'interaction lorsque les liposomes de PC contiennent 10% de phosphatidylglycérol (St-Onge, 1989). Ces lipides rendent la membrane plus négative, ce qui attire la choline vers la phase hydrophobe de la membrane, ce qui la rend donc moins disponible pour interagir avec l'actine.

Ce modèle permet d'ailleurs d'expliquer certains résultats que nous avons obtenus avec les moteurs à l'actomyosine. La seule différence qui existe dans la structure des deux phospholipides que nous avons choisis, le DOPC et le DSPC, est la présence d'une double liaison sur les chaînes carbonées du DOPC, comme le schématise la figure 27. L'insaturation en C9 du DOPC introduit un coude dans la chaîne carbonée, ce qui a pour effet de réduire les interactions entre les chaînes carbonées de lipides voisins. Cette différence se reflète dans la température de transition de ces deux PC: -22°C pour le DOPC et 58°C pour le DSPC (Machy & Leserman, 1987). Ceci a une conséquence directe sur l'état de la bicouche à température ambiante: les membranes de DOPC sont à l'état liquide-cristallin alors que celles de DSPC sont à l'état gel. L'aire moléculaire du DOPC, de 70 \AA^2 , est donc plus grande que celle du DSPC, qui est de $40\text{-}45 \text{ \AA}^2$ (P. Tancrede, communication personnelle). Comme la densité lipidique des liposomes de DOPC est moindre que celle des liposomes de DSPC, la bicouche de DOPC ne peut lier autant de magnésium par unité de surface que la bicouche de DSPC. Ceci implique que dans les liposomes de DSPC, la charge de la membrane a plus de charges positives par unité de surface. Il y a donc plus de cholines disponibles pour interagir avec l'actine dans les liposomes de DSPC que de DOPC, ce qui explique leurs indices de motilité supérieurs.

Quant au potassium, ce dernier n'affecte pas électriquement le dipôle phosphate-choline des PC directement puisque les cations monovalents ne se lient pas aux phospholipides (Cevc, 1990). L'effet inhibiteur du potassium que nous avons observé s'explique tout simplement parce qu'il entre en compétition avec la charge positive des PC pour les charges négatives de l'actine.

Figure 27. Structure moléculaire du DOPC et du DSPC.



4.3- L'interaction directe actine-lipides et la littérature

La quantité de résultats supportant l'interaction directe entre l'actine et les lipides peut sembler suffisante pour que tous considèrent l'existence de ce mode de liaison de l'actine à la membrane, mais ce n'est pas le cas. L'équipe d'Utsumi, qui s'est penchée sur ce mode d'ancrage, a fini par conclure, pour des raisons obscures, que l'interaction directe est peu probable *in vivo*. Seule l'équipe de Gicquaud supporte cette possibilité, appuyée par quelques autres travaux (Llerenas & Cid; 1985; Barmann & al; 1992) et de quelques observations parallèles (Ostlund & al; 1977; Sanders, 1983; Asch & al, 1990; Ward & al, 1990; Taylor & Taylor, 1992).

Les seules revues de la littérature qui aient commenté le sujet ont été écrites trop tôt pour citer les travaux de Gicquaud. Les résultats alors disponibles montraient que l'actine ne s'insère pas dans la bicouche, ce qui est logique car c'est une protéine très hydrophile (Sigrist-Nelson & al, 1977; Bercovici & Gitler, 1978; Meyer & Burger, 1979; Rotman & al, 1982). Ceci fait que les revues de l'époque ne font pas mention de la possibilité que l'actine se lie directement aux membranes (Niggli & Burger, 1987; Geiger 1983 et 1987). La plupart des récentes revues de la littérature évitent tout simplement le sujet (Luna, 1991; Luna & Hitt, 1992; Stossel, 1993).

On pourrait se demander pourquoi tant de chercheurs travaillent sur la liaison indirecte de l'actine aux membranes sans avoir jamais observé d'interaction directe. La plupart de ces travaux visent à démontrer que l'interaction actine-membrane est plus grande en présence qu'en absence d'une protéine. Il est donc de mise de procéder à une vérification-témoin de l'interaction entre l'actine et les membranes sans la protéine. Or aucun de ces auteurs n'a rapporté une interaction directe entre l'actine et les membranes, pour la simple raison que ces expériences se déroulent souvent dans des conditions ioniques pour lesquelles plusieurs de nos techniques ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter une interaction. Nous n'avons en effet détecté une interaction actine-lipides aux concentrations élevées de potassium qu'en calorimétrie différentielle (200 mM de KCl; 1 mM MgCl₂; Gicquaud, 1993), en turbidimétrie différentielle (100 mM de KCl et 1 mM MgCl₂; St-Onge, 1989) et,

dans le cadre de ce travail, par les moteurs à l'actomyosine (90 mM KCl et 4 mM MgCl₂).

Ainsi, Yamamoto & al (1987) ont observé une inhibition de la polymérisation de l'actine par la phosphatidylsérine (PS) en présence de 100 mM de KCl, mais avec seulement 0,2 mM de CaCl₂. De la même façon l'actine ne semble pas avoir interagi avec des liposomes de PC:PS en présence de 2 mM de MgCl₂ et de 100 mM de KCl (Kaufmann & al, 1992). Quand ce ne sont pas les cations divalents qui manquent, c'est la concentration trop élevée de cations monovalents qui pourrait expliquer l'absence d'interaction: Janmey & al (1987) utilisèrent 2 mM de MgCl₂ mais 150 mM de KCl. D'autres ont utilisé jusqu'à 150 mM de NaCl avec en plus 1 mM d'EDTA, un chélateur des cations divalents (Cohen & al, 1988). Mais malgré 150 mM de KCl, Asch & al (1990) ont noté que l'actine interagissait légèrement avec certains lipides.

L'équipe qui aurait eu le plus de chance d'observer l'interaction directe actine-lipides est sans contredit celle de Luna, dont l'objectif est de caractériser le rôle d'une protéine intrinsèque dans l'ancrage de l'actine aux membranes. Leurs expériences se déroulent en présence de 50 mM de KCl et de 1 mM MgCl₂ (Goodloe-Holland & Luna, 1984) ou 100 mM de KCl et de 2 mM de MgCl₂ (Shariff & Luna, 1990; Chia & al, 1993). Dans une série d'expériences, ces auteurs ont observé que ni les lipides purifiés de *Dictyostelium discoideum*, ni le DMPC ne nucléent la polymérisation de l'actine. Ils n'ont pas détecté d'interaction directe actine-lipides probablement parce que leurs expériences ont été effectuées en présence de 100 mM de KCl et de 2 mM de MgCl₂ (Anne Hitt, communication personnelle). Mais si l'on parcourt leurs travaux, on remarque qu'à quelques reprises ils font mention d'une interaction résiduelle entre l'actine et leurs membranes dépourvues de protéines. Et si l'on scrute leurs résultats, on trouve dans certains graphiques qu'il y a bien une interaction entre l'actine et leurs membranes traitées malgré leurs conditions ioniques défavorables (figures 2B et 9B de Luna & al, 1990). Ce fut le cas en viscosimétrie avec des membranes chauffées ou protéolysées en présence de 50 mM de KCl et 1 mM de MgCl₂ (Luna & al, 1981), par sédimentation avec des membranes chauffées en présence de 50 mM de KCl et 2 mM MgCl₂, mais pas dans le tampon-G (Schwartz & Luna, 1986).

Ce fut le cas aussi pour Tranter & al (1989 et 1991) par sédimentation en présence de 100 mM de KCl et 2 mM de $MgCl_2$.

Fowler & Pollard (1982) ont quant à eux remarqué une hausse de l'interaction entre l'actine et les membranes lorsque ces dernières sont chauffées ou protéolysées. Berruti (1991) a quant à lui omis de vérifier si, en absence de calpactine l'actine pouvait encore se lier aux liposomes, alors que ses conditions auraient pu permettre de constater une interaction directe.

Les seuls cas que nous ayons rencontrés où aucune interaction n'a été observée malgré des conditions ioniques favorables ont été rapportés par Davies (1984) et Mehrabian (1984). Ces auteurs eurent recours à la viscosimétrie de membranes chauffées ou traitées à la trypsine.

Ainsi ce sont les conditions ioniques défavorables qui font que très peu d'équipes ont détecté une interaction directe entre l'actine et les lipides. Malheureusement la plupart des protocoles expérimentaux qui sont proposés recommandent l'utilisation de tampons dont les conditions ioniques sont défavorables, par exemple seulement 1 mM de $MgCl_2$ et 100 mM de KCl (Carraway, 1992).

4.4- L'interaction directe actine-phospholipides peut-elle jouer un rôle *in vivo* ?

Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, il est difficile de répondre à la question qui est à la base de tout ce projet: l'interaction directe actine-lipides se produit-elle dans la cellule? En effet, pour y arriver il faudrait éliminer toutes les protéines accessoires liant l'actine aux membranes, ce qui est impossible. Nous devons donc faire les expériences *in vitro*, dont les conditions doivent être les plus proches que possible des conditions cellulaires. Mais qu'en est-il des interactions que nous avons décrites dans ce travail? Les conditions où nous avons observé une interaction sont-elles compatibles avec la réalité cellulaire?

Nous avons aussi soulevé dans l'introduction que certains faits nous portent à croire que l'actine qui interagit avec la bicouche pourrait ne pas être dans son état natif. Les résultats que nous avons accumulés grâce aux moteurs à l'actomyosine de Kron nous permettent-ils de trancher la question?

Finalement, nous ne savions rien de la force de l'interaction que l'équipe de Gicquaud étudie depuis plus de 10 ans. Est-elle suffisamment importante pour jouer un rôle?

4.4.1- Ce phénomène peut avoir lieu *in vitro* dans des conditions mimant les conditions *in vivo*?

a) L'actine

Tout comme l'ont fait nos prédécesseurs, nous avons observé une interaction stable des liposomes avec l'actine, qu'elle soit mise en contact avec les liposomes sous forme monomérique ou filamenteuse, et qu'elle soit purifiée par chromatographie ou non. Nous avons aussi observé le déplacement des liposomes à des concentrations d'actine allant de 0,125 à 3,2 mg/ml et à des rapports actine/lipide de 0,597 à 1,2 (mg/mg).

La concentration cellulaire d'actine est habituellement de 1 à 4 mg/ml, bien que certaines cellules peuvent en contenir plus: 7 mg/ml chez *Acanthamoeba* et plus de 40 mg/ml dans le muscle squelettique (Amos & Amos, 1991). Il y a donc suffisamment d'actine dans les cellules pour que ce paramètre ne soit pas le facteur qui détermine l'existence de l'interaction directe actine-lipides *in vivo*.

b) Les phospholipides

Outre les membranes plasmiques (où le cholestérol représente 25% des lipides, la phosphatidylcholine 18%) et le corps de Golgi, la classe de lipide la plus abondante est toujours la phosphatidylcholine (Carroll, 1989). Elle est présente dans les membranes des cellules de mammifères dans une proportion allant de 24 à 55% (Carroll, 1989). Pour ce qui est de la longueur des chaînes carbonées, la plupart des membranes cellulaires contiennent des phospholipides de 14 à 20 carbones, avec ou sans double liaison, quoique les plus abondants sont

les C16:1 (16 carbones, une double liaison), C18:0 et C20:4 (Shechter, 1990). Les lipides que nous avons choisis pour nos expériences, le DSPC (C18:0) et le DOPC (C18:1), sont des lipides abondants dans les membranes naturelles.

Le modèle que nous avons proposé, où la choline des PC lie directement une des charges négatives de l'actine, est compatible avec la composition lipidique des membranes naturelles. Notons en terminant que la concentration en liposomes ne semblait pas importante (nous avons observé des déplacements de 0,072 à 2 mg/ml de liposomes). Par contre la densité de charge à la surface de la bicouche lipidique est importante: les liposomes de DSPC sont plus mobiles que ceux de DOPC, qui ont une densité moins élevée.

c) Les cations divalents

Nos résultats ont clairement montré l'importance des cations divalents dans le déplacement des liposomes: le mouvement des liposomes, comme celui de l'actine, ne se produit qu'à partir d'une concentration de 1 mM de magnésium, et se poursuit jusqu'à 20 mM, concentration beaucoup plus élevée que celle rencontrée dans les cellules. Nous n'avons pas observé le déplacement d'actine à cette concentration, probablement parce qu'à force ionique élevée, l'affinité de la myosine pour l'actine est réduite.

La concentration de calcium libre des cellules est toujours faible (0,1 μ M; Amos & Amos, 1991) au point où elle ne serait pas suffisante pour permettre l'interaction actine-lipides. Ceci nous a poussé à étudier l'effet du magnésium, dont la concentration cellulaire est plus élevée. Cette concentration varie selon les auteurs, de 0,4 à 2,4 mM (Grazi & al, 1992) ou de 1 à 8 mM (Fulton, 1985), mais on peut s'entendre sur le fait qu'en général sa concentration est près (ou supérieure) au seuil d'activation (1 mM) pour que l'on observe une interaction directe actine-lipides.

d) Le potassium

La plupart des auteurs considèrent que la concentration cellulaire du potassium est d'environ 80-100 mM (Isenberg, 1991), bien que dans le muscle elle puisse être de 140 mM (Cevc, 1990).

À cette concentration, le potassium affecte grandement l'interaction électrostatique entre l'actine et les lipides, de sorte que plusieurs techniques ne sont pas assez sensibles pour la détecter. L'équipe de Gicquaud a observé, malgré l'effet inhibiteur du potassium, d'importantes interactions actine-lipides en calorimétrie différentielle jusqu'à 200 mM de KCl (2 mM MgCl_2 ; Gicquaud, 1993), en turbidimétrie différentielle (100 mM de KCl et 1 mM MgCl_2 ; St-Onge, 1989) et, dans le cadre de ce travail, par les moteurs à l'actomyosine (90 mM KCl, 4 mM MgCl_2 et 0,6% de méthylcellulose). Cinq autres articles rapportent d'ailleurs une interaction directe actine-lipide résiduelle dans le cadre de travaux sur l'interaction indirecte actine-membrane (voir la section 4.3).

e) Le méthylcellulose

Les cellules contiennent un facteur qui est absent des moteurs à l'actomyosine de Kron. Ce facteur permet à l'actine et à la myosine d'interagir aux concentrations cellulaires de potassium (environ 90 mM), alors que cette interaction ne subsiste pas au-delà de 50 mM dans nos moteurs. Plusieurs auteurs ont déjà remarqué cette concentration critique de KCl, qui tournerait autour de 60 mM dans les moteurs qui utilisent l'HMM (Higashi-Fujime, 1991). Il est généralement admis que l'affinité de la myosine pour l'actine diminue à mesure que la force ionique augmente (Meg Titus, communication personnelle).

La méthylcellulose (MC), qui augmente la viscosité des solutions, permet de compenser l'inhibition par le potassium. En réduisant le mouvement brownien, la MC garde les filaments près de la surface, augmentant ainsi les probabilités d'interaction entre l'actine et la myosine. La MC nous a permis d'observer le déplacement des filaments d'actine jusqu'à 80 mM de KCl (à 1,2%), et celui des liposomes à 90 mM (à 0,6%). Pour rétablir la motilité, la concentration de méthylcellulose (MC) requise doit être moins importante pour les liposomes (0,6%) que pour les filaments. On peut facilement comprendre qu'entre 0,6 et 1,2%, le MC rend la solution suffisamment visqueuse pour ralentir le déplacement des liposomes de DSPC (à 70 et 80 mM de KCl, fig. 20). Les filaments d'actine, étant de beaucoup plus petite taille que les liposomes, ne sont pas gênés par cette augmentation de la viscosité. Le MC est une molécule inerte de haut poids moléculaire qui est couramment utilisée dans les moteurs. Il semble qu'en

présence de MC les filaments d'actine ont tendance à rester près de la surface et sont moins perturbés par le mouvement brownien, sans que cela n'affecte leur vitesse. Selon Uyeda & al (1990), ces effets de la MC s'expliquent non pas par l'augmentation de la viscosité mais par un effet de ce solvant sur les filaments.

Une étude de Mastro & Keith (1984) peut nous aider à comprendre l'effet de la MC. Ces auteurs ont mesuré les constantes de diffusion de plusieurs protéines dans le cytoplasme et dans l'eau. Grâce à ces données, ils ont pu calculer les viscosités apparentes de solutions de différentes protéines à concentrations égales. Ce qui est particulièrement frappant, c'est que toutes les solutions de protéines n'ont pas la même viscosité apparente dans les cellules: par exemple 93 cP pour une solution d' α -actinine et 179 cP pour une solution d'actine. Ce n'est pas la viscosité de la cellule (de 2 à 3 cP) qui réduit la diffusion des protéines mais bien leurs interactions avec d'autres protéines (Mastro & Keith, 1984). La viscosité d'une préparation d'actine purifiée dans un tampon est proche de celle de l'eau (1,1 cP). Ceci implique que dans nos moteurs, l'actine diffuse environ 163 fois plus que dans la réalité cellulaire. On comprend maintenant l'utilité de la MC, dont la viscosité à 2% est de 15 cP (valeur fournie par Sigma), dans les moteurs à l'actomyosine: en réduisant les mouvements latéraux des filaments, le MC imite le facteur cellulaire qui permet à l'actine et à la myosine d'interagir malgré les concentrations élevées de potassium.

Les moteurs à l'actomyosine de Kron ne peuvent donc pas reproduire la réalité cellulaire sans MC. L'utilisation de la MC est tout à fait justifiée dans le cadre de notre travail puisque sans elle, le déplacement des filaments d'actine est inhibé, ce qui nous empêche de vérifier par cette technique qu'une interaction directe actine-lipides subsiste aux conditions ioniques physiologiques.

Les moteurs à l'actomyosine nous ont permis d'observer le déplacement de liposomes de DSPC en présence de 4 mM de $MgCl_2$, 90 mM de KCl et 0,6% de méthylcellulose. Ces conditions expérimentales étant compatibles avec la réalité cellulaire, le déplacement que nous avons observé suggère que l'interaction directe entre l'actine et les lipides peut exister dans la cellule.

4.4.2- L'actine qui interagit avec les lipides est-elle dans un état fonctionnel ?

Les récents résultats de Gicquaud (1993) en calorimétrie différentielle montrent que le pic de dénaturation thermique de l'actine disparaît lorsqu'elle interagit avec les liposomes. Ce fait nous rappelle qu'à l'exception des spectres de fluorescence intrinsèque de l'actine (St-Onge, 1989), à ce jour aucun résultat ne nous permet de croire que l'actine est dans un état natif et fonctionnel à la surface des liposomes. D'ailleurs toutes les tentatives de décoration à l'HMM des filaments d'actine interagissant avec les liposomes furent des échecs (Rioux & Gicquaud, 1985; N. Cermakian, communication personnelle).

Les moteurs à l'actomyosine de Kron nous ont permis de faire la lumière sur ce point. L'interaction HMM-actine-liposomes permet en effet le déplacement des liposomes. Deux mécanismes peuvent expliquer ce phénomène: ou bien c'est la portion des filaments d'actine qui dépasse des liposomes qui interagit avec les HMM, ou c'est l'actine directement liée aux lipides qui interagit avec les HMM. Nos résultats ne nous permettent pas de trancher, bien que le premier mécanisme soit compatible avec nos observations en microscopie de fluorescence et avec certains clichés en microscopie électronique.

Si le premier mécanisme est vrai, cela implique qu'au moins une partie du filament d'actine est fonctionnelle. Si c'est le second mécanisme, cela implique que l'actine liant les lipides est fonctionnelle puisqu'elle peut interagir à la fois avec les lipides et la myosine. Dans un cas comme dans l'autre, le lien direct d'un filament d'actine à une bicouche n'empêche pas ce dernier d'interagir avec la myosine, ce qui lui permettrait d'intervenir dans certaines formes de motilité.

4.4.3- L'interaction directe actine-lipides est-elle suffisamment forte pour jouer un rôle *in vivo* ?

À ce jour aucun résultat ne nous permettait de qualifier la force de l'interaction directe actine-lipide, donc de savoir si cette interaction pouvait jouer un rôle dans la cellule. Les résultats obtenus grâce aux moteurs à

l'actomyosine nous permettent d'affirmer que l'interaction directe entre l'actine et les lipides est suffisamment forte pour déplacer des liposomes de quelques microns de diamètre. Comme les filaments qui interagissent avec les lipides sont dans un état fonctionnel, l'actine est en mesure de soutenir la bicouche et de participer à la motilité cellulaire en déplaçant les membranes (motilité vésiculaire, invaginations de la membrane plasmique, extensions membranaires), et tout cela sans avoir nécessairement recours aux protéines accessoires liant l'actine aux membranes.

4.4.4- L'interaction directe actine-phospholipides peut-elle jouer un rôle *in vivo* ?

Les trois questions des sections précédentes convergent vers une seule question qui est à la base de l'ensemble de ce projet de recherche: L'interaction directe actine-phospholipides peut-elle jouer un rôle *in vivo* ?

Nous avons montré *in vitro* que l'interaction actine-lipides permettait le déplacement de liposomes de DSPC en présence de 4 mM de $MgCl_2$, 90 mM de KCl et 0,6% de méthylcellulose. Comme ces conditions expérimentales sont compatibles avec les conditions cellulaires, nous pouvons en déduire que dans la cellule l'interaction directe actine-lipides est possible, que l'actine y est fonctionnelle, donc que cette interaction est suffisamment forte pour jouer un rôle dans la cellule.

Mais si l'interaction directe existe *in vivo*, comment est-elle contrôlée? On sait que dans la plupart des cellules l'actine tapisse la face interne de la membrane plasmique. L'ancrage de l'actine à la membrane dépend à la fois du mode indirect (actine \rightarrow protéines accessoires \rightarrow lipides) et du mode direct (actine \rightarrow lipides). Dans les deux cas, la cellule doit avoir un moyen d'empêcher la liaison de l'actine à la membrane. Par exemple, il arrive que la cellule doive retirer des filaments pour permettre l'exocytose de vésicules. La motilité vésiculaire le long de filament d'actine ne serait d'ailleurs pas possible si l'interaction directe était toujours présente.

Alors que plusieurs activités cellulaires sont contrôlées par le calcium, nos résultats nous permettent de croire que les variations de l'ordre du micromolaire dans la concentration intracellulaire de calcium ne sont pas suffisantes pour affecter l'interaction directe actine-phospholipides. Quelques facteurs pourraient contrôler localement cette interaction. Des variations de potentiel membranaire pourraient affecter la conformation des PC, ce qui modulerait l'interaction de la choline avec l'actine. Une autre possibilité, plus simple, impliquerait l'intervention de protéines accessoires comme cela a été proposé pour expliquer la dépolymérisation de l'actine précédant l'exocytose des granules de sécrétion (Trifaro & al, 1992).

5- CONCLUSIONS

À l'aide de la technique des moteurs à l'actomyosine de Kron, nous avons découvert que le déplacement bidirectionnel de liposomes est possible par l'interaction myosine-actine-liposomes. Aucune publication n'a encore fait état du déplacement de liposomes sur une surface de myosine par l'entremise de l'actine.

L'objectif de ce travail était de démontrer que l'interaction directe actine-lipides peut jouer un rôle *in vivo*.

Les résultats obtenus grâce à une version adaptée de moteurs à l'actomyosine nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

1-Il y a bel et bien une interaction entre l'actine et les phospholipides, et cette interaction semble directe.

2-Cette interaction est suffisamment forte pour permettre le déplacement de liposomes sur une surface de myosine, par l'entremise de l'actine.

3-Il s'agit d'une interaction spécifique entre l'actine et les phospholipides puisque le déplacement des liposomes dépend de la nature des lipides qui les composent.

4-Le déplacement des liposomes implique que les filaments d'actine interagissent à la fois avec les phospholipides et la myosine. Cela suggère que l'actine qui interagit avec les liposomes est dans un état fonctionnel.

5-L'interaction directe de l'actine avec les phospholipides se fait dans des conditions qui sont compatibles avec les conditions *in vivo*. L'existence d'une telle interaction dans la cellule est donc possible.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams R.J. & T.D. Pollard Binding of myosin I to membrane lipids. *Nature* **340**: 565-588, 1989.
- Amos L.A. & W.B. Amos. In: *Molecules of the Cytoskeleton*. Guilford Press, New York. 253 p., 1991.
- Anson, M. Temperature dependence and Arrhenius activation energy of F-Actin velocity generated *in vitro* by skeletal myosin. *J. Mol. Biol.* **224** (4): 1029-1038, 1992.
- Asch H.L., E. Mayhew, R.O. Lazo & B.B. Asch. Lipids noncovalently associated with keratins and other cytoskeletal proteins of mouse mammary epithelial cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* **1034** (3): 303-308, 1990
- Bally M., M. Hope, L. Mayer, T. Madden, & P. Cullis. Liposomes as drug carriers (Gregoriadis G. ed.) pp.841-853, John Wiley and Sons, Toronto, 1988.
- Barmann M., J. Kas, H. Kuzmeier & E. Sackmann. A new cell model- Actin networks encaged by giant vesicles. In: *The structure and conformation of amphiphilic membranes*. Lipowsky, Richter & Kremer eds. Springer Proceedings in Physics vol.66, p. 137-143, 1992.
- Bartels E.M. & G.F. Elliott. Donnan potentials from the A and I-band of glycerinated and chemically skinned muscle relaxed and in rigor. *Biophys. J.* **48**: 61-76, 1985.
- Bercovici T. & C. Gitler. 5-[125I]iodonaphtyl azide, a reagent to determine the penetration of proteins into the lipid bilayer of biological molecules. *Biochemistry* **17**: 1485-1489, 1978.
- Berruti G. Evidence for Ca²⁺-mediated F-actin/phospholipid binding of human sperm calpactin II. *Cell. Biol. Int. Rep.* **15** (10): 917-927, 1991.
- Broekaert D. Cytoskeletal polypeptides: Cell-type specific markers useful in investigative otorhinolaryngology. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **27** (1): 1-20, 1993.
- Carraway C.A.C. Association of cytoskeletal proteins with membranes. In: *The cytoskeleton. A practical approach*. K.L. Carraway & C.A.C. Carraway eds. IRL Press, New York. p.123-150, 1992.
- Carroll, M. *Organelles*. M. Carroll ed.. Guilford press, New York. 202 p., 1989
- Cermakian N., C. Thibault, P. Wong & C. Gicquaud. Recherche du mécanisme moléculaire de l'interaction entre l'actine et les lipides membranaires. Affiche présentée au 60^{ème} congrès de l'Association canadienne-française pour l'avancement des sciences, Montréal, Québec, 1992.

- Cevc, G. Membrane electrostatics. *Biochim. Biophys. Acta* **1031** (3): 311-382, 1990.
- Chia C.P., A. Shariff, S.A. Savage & E.J. Luna. The integral membrane protein, ponticulin, acts as a monomer in nucleating actin assembly. *J. Cell Biol.* **120** (4): 909-922, 1993.
- Chia C.P., A.L. Hitt & E.J. Luna. Direct binding of F-actin to ponticulin, an integral plasma membrane glycoprotein. *Cell Motil. Cytoskeleton* **18** (3): 164-179, 1991.
- Cohen A.M., S.C. Liu, J. Lawler, L. Derick & J. Palek. Identification of the protein 4.1 binding site to phosphatidylserine vesicles. *Biochemistry* **27** (2): 614-619, 1991.
- Cook R.K., D. Root, C. Miller, E. Reisler & P.A. Rubenstein. Enhanced stimulation of myosin subfragment 1 ATPase activity by addition of negatively charged residues to the yeast actin NH₂ terminus. *J. Biol. Chem.* **268** (4): 2410-2415, 1993.
- Cortese J.D., B. Schwab III, C. Frieden & E.L. Elson. Actin polymerization induces a shape change in actin-containing vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** (15): 5773-5777, 1989.
- Davies G. Association of actin with the platelet membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **772**: 149-160, 1984.
- Dentler W. Microtubule-membrane interactions in cilia and flagella. *Int. Rev. Cytol.* **72**: 1-47, 1984.
- Doberstein S.K. & T.D. Pollard. Localization and specificity of the phospholipid and actin binding sites on the tail of *Acanthamoeba* myosin IC. *J. Cell Biol.* **117** (6): 1241-1249, 1992.
- Forget J., F. Pothier & P. Couillard. Un modèle de surplatine à température contrôlée pour les observations microscopiques prolongées de matériel vivant. *Microsc. Acta* **85** (2): 121-125, 1981.
- Fowler V.M. & V. Bennett. Erythrocyte membrane tropomyosin. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **259**: 5978-5989, 1984.
- Fowler V.M. & H.B. Pollard. Chromaffin granule membrane-F-actin interactions are calcium sensitive. *Nature* **295**: 336-339, 1982.
- Freed B.M., B. Moyazeni, D.A. Lawrence, F.R. Wallach & N. Lempert. *Cell Immunol.* **101**: 181-194, 1986.
- Fulton A. Treadmilling, diffusional exchange and cytoplasmic structures. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **6**: 263-273, 1985.
- Geiger B. Microfilament-membrane interaction. *TIBS* **10**: 456-460, 1985.

- Geiger B. Membrane-cytoskeleton interaction. *Biochim. Biophys. Acta.* **737**(3-4): 305-341, 1983
- Gert de Couet H, S. Stowe & D. Blest. Membrane-associated actin in the rhabdomeral microvilli of crayfish photoreceptors. *J. Cell Biol.* **98**: 834-846, 1984.
- Gicquaud C. Actin conformation is drastically altered by direct interaction with membrane lipids: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry* **32**: 11873-11877, 1993.
- Goldberg D.J. & D.W. Burmeister. Microtubule-based filopodium-like protrusions form after axotomy. *J. Neurosci.* **12** (12): 4800-4807, 1992.
- Goldman & Steinert. Cellular and molecular biology of intermediate filaments. Plenum Press, New York. 479 p., 1990.
- Goodloe-Holland C.M. & E.J. Luna. A membrane cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum*. III. Plasma membrane fragments bind predominantly to the sides of actin filaments. *J. Cell Biol.* **99** (1): 71-78, 1984.
- Grazi E., P. Cuneo & A. Cataldi. The control of cellular shape and motility. *Biochem. J.* **288**: 727-732, 1992.
- Grimard R., P. Tancrede & C. Gicquaud. Interaction of actin with positively charged phospholipids: a monolayer study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190** (3): 1017-1022, 1993.
- Gruenstein E, E. Rich & R. Weihing. Actin associated with membranes from 3T3 mouse fibroblasts and HeLa cells. *J. Cell Biol.* **64**: 223-234, 1975.
- Hayden S.M., J.S. Wolenski & M.S. Mooseker. Binding of brush border myosin I to phospholipid vesicles. *J. Cell Biol.* **111** (2): 443-451, 1990.
- Heise H., T. Bayerl, G. Isenberg & E. Sackmann. Human platelet P-235, a talin-like actin binding protein, binds selectively to mixed lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1061** (2): 121-131, 1991.
- Herbette L., C.A. Napolitano & R.V. McDaniel. Direct determination of the calcium profile structure for dipalmitoyllecithin multilayers using neutron diffraction. *Biophys. J.* **46**: 677-685, 1984.
- Higashi-Fujime S. Reconstitution of active movement *in vitro* based on the actin-myosin interaction. *Int. Rev. Cytol.* **125**: 95-138, 1991.
- Homsher E., F. Wang & J.R. Sellers, Factors affecting movement of F-actin filaments propelled by skeletal muscle heavy meromyosin. *Am. J. Physiol (Cell Physiol.* **31**): C714-C723, 1992.
- Honda H., H. Nagashima & S. Asakura. Directional movement of F-actin *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **191** (1): 131-133, 1986.

- Hotani H. & H. Miyamoto. Dynamic features of microtubules as visualized by dark-field microscopy. *Adv. Biophys.* **26**: 136-156, 1990.
- Hynes T.R., S.M. Block, B.T. White & J.A. Spudich. Movement of myosin fragments *in vitro*: domains involved in force production. *Cell* **48**: 953-963, 1987.
- Isenberg G. Actin binding proteins-lipid interactions. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **12**: 136-144, 1991.
- Jacobson B.S. Interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton: an overview. *Tissue and Cell* **6** (15): 829-852, 1983.
- Janmey P.A., K. Iida, H.L. Yin & T.P. Stossel. Polyphosphoinositide micelles and polyphosphoinositide-containing vesicles dissociate endogenous gelsolin-actin complexes and promote actin assembly from the fast-growing end of actin filaments blocked by gelsolin. *J. Biol. Chem.* **262** (25): 12228-12236, 1987.
- Jones J.C.R. & K. J. Green. Intermediate filament-plasma membrane interactions. *Current Opinions in Cell Biology* **3**: 127-132, 1991.
- Kaufmann S., J. Kas, W.H. Goldmann, E. Sackmann & G. Isenberg. Talin anchors and nucleates actin filaments at lipid membranes. *FEBS* **2** (314): 203-205, 1992.
- Klausner R.D., N. Kumar, J.N. Weinstein, R. Blumenthal & M. Flavin. Interaction of tubulin with phospholipid vesicles I. Association with vesicles at the phase transition. *J. Biol. Chem.* **256** (11): 5879-5885, 1981.
- Kohno K. & M.A. Morales. Exposure of actin thiols by the removal of tightly held calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7904-7908, 1985.
- Kron S.J. & J.A. Spudich. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6272-6276, 1986.
- Kron S.J., Y.Y. Toyoshima, T.Q.P. Uyeda & J.A. Spudich. Assays for actin sliding movements over myosin-coated surfaces. *Methods in Enzymology* **196**: 399-416, 1991.
- Kumar N., R. Blumenthal, M. Henkart, J.N. Weinstein & R.D. Klausner. Insertion of tubulin into the bilayer of dipalmitoyl phosphatidylcholine vesicles at the phase transition results in the formation of stable vesicle-tubulin complexes. *J. Biol. Chem.* **257** (24): 15137-15144, 1982.
- Kumar N., R.D. Klausner, J.N. Weinstein, R. Blumenthal & M. Flavin. Interaction of tubulin with phospholipid vesicles II. Physical changes of the protein. *J. Biol. Chem.* **256** (11): 5886-5889, 1981.
- Kuznetsov S.A., G.M. Langford, & D.G. Weiss. Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* **356**: 722-725, 1992.

- Laliberte A. & C. Gicquaud. Polymerization of actin by positively charged liposomes. *J. Cell Biol.* **106** (4): 1221-1227, 1988.
- Li D. & P.D. Chantler. Evidence for a new member of the myosin I family from mammalian brain. *J. Neurochem.* **59** (4): 1344-1351, 1992.
- Lillie & Brown. Suppression of a myosin defect by a kinesin-related gene. *Nature* **356**: 358-361, 1992.
- Lindberg U., A.S. Höglund & R. Karlsson. On the ultrastructural organization of the microfilament system and the possible role of profilactin. *Biochimie* **63**: 307-323, 1981.
- Llerenas E & M.E. Cid. The molecular interaction between F-actin and lecithin in a phospholipid monolayer system. *Bol. Estud. Med. Biol.* **33** (1-8): 33-39, 1984.
- Luna E.J. & A.L. Hitt. Cytoskeleton-Plasma Membrane Interactions. *Science* **258**: 955-964: 1992.
- Luna E.J. & J.S. Condeelis. Actin-associated proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.* **11** (5-6): 328-332, 1990.
- Luna E.J. Molecular links between the cytoskeleton and membranes. *Curr. Opin. Cell Biol* **3** (1): 120-126, 1991.
- Luna E.J., L.J. Wuesthube, H.M. Ingalls & C.P. Chia. The *Dictyostelium discoideum* plasma membrane. *Advances in Cell Biology* **3**: 1-34, 1990
- Luna E.J., V.M. Fowler, J. Swanson, D. Branton & D.L. Taylor. A membrane cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum*. I. Identification and partial characterization of an actin-binding activity. *J. Cell Biol.* **88**: 396-409, 1981.
- Macdonald P.M. & J. Seelig. Calcium binding to mixed phosphatidylglycerol-phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **26** (5): 1231-1240, 1987.
- Machy P. & L. Leserman. Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie. INSERM, Paris. 177 p, 1987.
- Margossian S.S., J.W. Krueger, J.R. Sellers, G. Cuda, J.B. Caulfield, P. Norton & H.S. Slayter. Influence of the cardiac myosin hinge region on contractile activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **88** (11): 4941-4945, 1991.
- Mastro A.M. & A.D. Keith. Diffusion in the aqueous compartment. *J. Cell Biol.* **99** (1): 180s-187s, 1984.
- Mehrabian M., K.J. Bame & L.H. Rome. Interaction of rat liver lysosomal membranes with actin. *J. Cell Biol.* **99** (2): 680-685, 1984.

- Meyer D. & M. Burger. The chromaffin granule surface: the presence of actin and the nature of its interaction with the membrane. *FEBS letter* **101**: 129-133, 1979.
- Miyamoto S., T. Funatsu, S. Ishiwata & S. Fujime. Changes in mobility of chromaffin granules in actin network with its assembly and Ca^{2+} -dependent disassembly by gelsolin. *Biophys. J.* **64** (4): 1139-1149, 1993.
- Miyata H. & H. Hotani. Morphological changes in liposomes caused by polymerization of encapsulated actin and spontaneous formation of actin bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** (23): 11547-11551, 1992.
- Niggli V & M. Gimona. Evidence for a ternary interaction between alpha-actinin, metavinculin, vinculin and acidic-phospholipid bilayers. *Eur. J. Biochem.* **213** (3): 1009-1015, 1993.
- Niggli V & M.M. Burger. Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Memb. Biol.* **100** (2): 97-121, 1987.
- Niggli V. Lipid-cytoskeleton interactions. *Nature* **361**: 214, 1993.
- Nonomura Y., E. Katayama & S. Ebashi S. Effect of phosphates on the structure of the actin filament. *J. Biochem. (Tokyo)* **78**: 1101-1104, 1975.
- Okimasu E., K. Nobori, S. Kobayashi, E. Suzuki, S. Terada & K. Utsumi. Inhibitory effect of cholesterol on interaction between cytoplasmic actin and liposomes, and restorative effect of high osmotic pressure. *Cell Struct. Funct.* **12** (2): 187-195, 1987.
- Okimasu E., Y. Fujii, T. Utsumi, M. Yamamoto & K. Utsumi. Cytoplasmic proteins, association with phospholipid vesicles and its dependency on cholesterol. *Cell Struct. Funct.* **11**: 273-283, 1986.
- Ostlund R.E., J.J. Leung & D.M. Kipnis. Muscle actin filaments bind pituitary secretory granules *in vitro*. *J. Cell Biol.* **73**: 78-87, 1977.
- Paller M.S. Lateral diffusion of lipids in renal cells: effects of hypoxia and reoxygenation and role of cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* **264**: C201, 1993.
- Petersheim M., H.N. Halladay & J. Blodnieks. Tb^{3+} and Ca^{2+} binding to phosphatidylcholine. *Biophys. J.* **56**: 551-557, 1989.
- Pigeon, B. Étude de l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires (liposomes) par calorimétrie différentielle à balayage et microscopie électronique. Mémoire de maîtrise en biophysique, UQTR, 130 p., 1992.
- Pollard T.D. & E.D. Korn. Electron microscopy identification of actin associated with isolated plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **248** (2): 448-450, 1973.

- Rayment I., H.M. Holden, M. Whittaker, C.B. Yohn, M. Lorenz, K.C. Holmes & R.A. Milligan. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**: 58-65, 1993.
- Rioux L. & C. Gicquaud. Actin paracrystalline sheets formed at the surface of positively charged liposomes. *J. Ultrastruct. Res.* **93** (1-2): 42-49, 1985.
- Rotman A., J. Heldman & S. Linder. Association of membrane and cytoplasmic proteins with the cytoskeleton in blood platelets. *Biochemistry* **21**: 1713-1719, 1982.
- Sanders S.K. & S.W. Craig. A lymphocyte cell surface molecule that is antigenically related to actin. *J. Immunol.* **131** (1): 370-376, 1983.
- Scherer P.G. & J. Seelig. Electric charge effects on phospholipid headgroups. Phosphatidylcholine in mixtures with cationic and anionic amphiphiles. *Biochemistry* **28** (19): 7720-7728, 1989.
- Scherer P.G. & J. Seelig. Structure and dynamics of the phosphatidylcholine and the phosphatidylethanolamine head group in L-M fibroblasts as studied by deuterium nuclear magnetic resonance. *EMBO-J.* **6** (10): 2915-2922, 1987.
- Schwartz M.A. & E.J. Luna. Binding and assembly of actin filaments by plasma membranes from *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **102** (6): 2067-2075, 1986.
- Seelig J. Interaction of phospholipids with Ca^{2+} ions. On the role of the phospholipid head groups. *Cell Biol. Int. Rep.* **14** (4): 353-360, 1990.
- Seelig J., P.M. Macdonald & P.G. Schere. Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. *Biochemistry* **26** (24): 7535-7541, 1987.
- Segawa A. & S. Yamashina. Role of microfilaments in exocytosis: a new hypothesis. *Cell Struct. Funct.* **14** (5): 531-544, 1989.
- Senter L., M. Luise, C. Presotto, R. Betto, A. Teresi, S. Ceoldo & G. Salviati. Interaction of dystrophin with cytoskeletal proteins: binding to talin and actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192** (2): 899-904, 1993.
- Shariff A. & E.J. Luna. *Dictyostelium discoideum* plasma membranes contain an actin-nucleating activity that requires ponticulin, an integral membrane glycoprotein. *J. Cell Biol.* **110** (3): 681-692, 1990.
- Shechter E. Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels. E. Shechter ed. Masson, Paris. 414 p., 1990.
- Sheetz M.P. & J.A. Spudich. Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables *in vitro*. *Nature* **303**: 31-35, 1983.

- Sigrist-Nelson K., H. Sigrist, T. Bercovici & C. Gitler. Intrinsic proteins of the intestinal microvillus membrane. Iononaphthylazide labeling studies. *Biochim. Biophys. Acta* **468**: 163-176, 1977.
- Small J.V. Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J. Cell Biol.* **91**: 695-705, 1981.
- Spudich J. & S. Watt. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**: 4866-4871, 1971.
- St-Onge D. & C. Gicquaud. Evidence of direct interaction between actin and membrane lipids. *Biochem. Cell Biol.* **67** (6): 297-300, 1989.
- St-Onge D. Étude de l'interaction entre l'actine et les lipides membranaires. Thèse de doctorat en biophysique, UQTR, 212 p., 1989.
- St-Onge D., C. Gicquaud. Research on the mechanism of interaction between actin and membrane lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167** (1): 40-47, 1990.
- Stephens R.E. Membrane tubulin. *Biol. Cell* **57**: 95-110, 1986.
- Stossel, T.P. On the Crawling of Animal Cells. *Science* **260**: 1086-1094, 1993.
- Taylor K.A. & D.W. Taylor. Formation of 2-D paracrystals of F-actin on phospholipid layers mixed with quaternary ammonium surfactants. *J. Struct. Biol.* **108** (2): 140-147, 1992.
- Toyoshima Y.Y., S.J. Kron, E.M. McNally, K.R. Niebling, C. Toyoshima & J.A. Spudich. Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments *in vitro*. *Nature* **328**: 536-539, 1987.
- Tranter M.P., S.P. Sugrue & M.A. Schwartz. Binding of actin to liver cell membranes: the state of membrane-bound actin. *J. Cell Biol.* **112** (5): 891-901, 1991.
- Tranter M.P., S.P. Sugrue & M.A. Schwartz. Evidence for a direct, nucleotide-sensitive interaction between actin and liver cell membranes. *J. Cell Biol.* **109** (6): 2833-2840, 1989.
- Trayer I.P. Coming soon - the movie. *Nature* **364**: 101-103, 1993.
- Trifaro J.M., A. Rodriguez-del-Castillo & M.L. Vitale. Dynamic changes in chromaffin cell cytoskeleton as prelude to exocytosis. *Mol. Neurobiol.* **6** (4): 339-358, 1992.

- Utsumi K., E. Okimasu, Y. Takehara, S. Watanabe, M. Miyahara & Y. Moromizato. Interaction of cytoplasmic proteins with liposomes and their cell specificity. *FEBS Lett.* **124** (2): 257-260, 1981.
- Utsumi K., E. Okimasu, Y.M. Morimoto, Y. Nishihara & M. Miyahara. Selective interaction of cytoskeletal proteins with liposomes. *FEBS Lett.* **141** (2): 176-180, 1982.
- Uyeda T.Q.P., S.J. Kron & J.A. Spudich. Myosin step size. Estimation from slow sliding movement of actin over low densities of heavy meromyosin. *J. Mol. Biol.* **241**: 699-710, 1990.
- Vandekerckhove J. & K. Weber. Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *J. Mol. Biol.* **120**: 783-802, 1978.
- Ward R.J., J.F. Menetret, F. Pattus & K. Leonard. Method for forming two-dimensional paracrystals of biological filaments on lipid monolayers. *J. Electron Microsc. Tech.* **14** (4): 335-41, 1990.
- Warshaw D.M., J.M. Desrosiers, S.S. Work & K.M. Trybus. Smooth muscle myosin cross-bridge interactions modulate actin filament sliding velocity *in vitro*. *J. Cell Biol.* **111**: 435-463, 1990.
- Weinstein J.N., R. Blumenthal & R.D. Klausner. Carboxyfluorescein leakage assay for lipoprotein-liposome interaction. *Methods in Enzymol.* **128**: 657-668, 1986.
- Wuestchube L.J. & E.J. Luna. F-actin binds to the cytoplasmic surface of ponticulín, a 17-kD integral glycoprotein from *Dictyostelium discoideum* plasma membranes. *J. Cell Biol.* **105** (4): 1741-1751, 1987.
- Yamamoto T., M. Nojima, M. Yamamoto, S. Ishiura & H. Sugita. Effect of phosphatidyl-L-serine and vinculin on actin polymerization. *Int. J. Biochem.* **19** (2): 121-125, 1987.
- Yanagida T., Y. Harada & A. Ishijima. Nano-manipulation of actomyosin molecular motors *in vitro*: a new working principle. *TIBS* **18**: 319-324, 1993.
- Zimmerle C.T., K. Patane & C. Frieden. Divalent cation binding to the high- and low-affinity sites on G-actin. *Biochemistry* **26** (20): 6545-6552, 1987.